

Dossier : Actualités en reproduction équine

Equipe Reproduction Equine, INRA-Haras Nationaux, PRMD, 37380 Nouzilly

La production par une jument d'un poulain par an (et pourquoi pas de plusieurs) avec de la semence d'étalon conservée fraîche ou congelée est l'objectif appliqué actuel de toutes les équipes de recherche. Un point très détaillé en français dans les domaines couverts par notre équipe avait été fait en 1992 dans le Recueil de Médecine vétérinaire (volume 168, numéro 11-12). Depuis, de nouvelles connaissances ou de nouvelles technologies ont vu le jour et il était important de les mettre à disposition d'un large public.

Le phénomène d'inactivité ovarienne en début de saison de monte limite le nombre de cycles disponibles pour une fécondation. Des études ont permis d'affiner les conditions des traitements lumineux. Des traitements longs à la mélatonine pourraient permettre de décaler le rythme annuel de reproduction de la jument.

Le développement des follicules ovariens est sous le contrôle des hormones hypophysaires FSH et LH, et de facteurs intra-ovariens dont l'inhibine.

La maîtrise du nombre d'ovulations permettrait (lors de transfert embryonnaire) de pouvoir produire plusieurs embryons par cycle. Des essais de superovulation sont en cours qui utilisent la FSH exogène ou l'effet anti-inhibine. La maîtrise du moment de l'ovulation peut se faire classiquement par injection d'hCG mais aussi par l'administration de GnRH sous forme d'implant.

La croissance et la maturation du follicule dominant, ainsi que l'atrésie des follicules dominés, se caractérisent par l'évolution intrafolliculaire de nombreux paramètres biochimiques dont certains ont été étudiés dans l'espèce équine.

Sous échographie transvaginale, le rythme de collecte d'ovocytes le plus rentable est de deux ponctions au cours du même cycle (l'une en fin de croissance folliculaire, l'autre en phase lutéale) : on obtient alors 9 ovocytes en moyenne. La maturation de l'ovocyte provient des maturations respectives du cumulus, du cytoplasme et du noyau.

La fécondation in vitro (FIV) n'ayant donné que des résultats moyens, d'autres techniques de reproduction assistée sont utilisées actuellement avec plus de succès au laboratoire : 1) la mise en place de l'ovocyte d'une donneuse soit dans l'oviducte (GIFT), soit dans le follicule (TOIF) d'une receveuse, avec fécondation de la receveuse et 2) l'introduction d'un spermatozoïde directement dans le cytoplasme de l'ovocyte (ICSI).

Le transfert d'embryon est utilisé sur le terrain en France principalement pour des juments de haute valeur génétique. Le transport d'embryons frais, mais surtout l'utilisation de la congélation des embryons, simplifieront la gestion entre donneuse et receveuse.

La baisse de fertilité observée sur les étalons de plus de 15 ans est fréquemment associée à un profil hormonal caractéristique (niveau basal de FSH et de

LH élevé, d'oestrogène diminué, niveau de testostérone non modifié après induction à l'hCG). Ceci pourrait être la conséquence d'une dégénérescence testiculaire primaire.

L'évolution des travaux sur la conservation de la semence a abouti à la mise au point de deux grands types de techniques d'insémination : en semence fraîche et en semence congelée. Les résultats obtenus dans les Haras Nationaux montrent que la fertilité par cycle est proche pour les deux types de technique. L'effort doit porter en partie sur des améliorations techniques qui permettront d'avoir accès à toutes les techniques de conservation et d'insémination artificielle pour la grande majorité des étalons.

Les critères d'évaluation de la qualité de la semence utilisés en routine (examen de la mobilité essentiellement) ne donnent pas entièrement satisfaction puisqu'ils ne permettent pas de "détecter" certains étalons dont la fertilité se révèle réduite. La plupart des fonctions cellulaires des spermatozoïdes peuvent être explorées : intégrité des membranes, de l'acrosome, stabilité de la chromatine, activité des mitochondries... Cependant les relations de ces fonctions entre elles et, surtout, les relations entre ces fonctions et la fertilité ne sont pas encore très claires.

D. GUILLAUME

INRA-Haras
Nationaux, PRMD,
Equipe Reproduction
Equine, 37380 Nouzilly

e-mail :
Daniel.Guillaume@
tours.inra.fr

Effet de la saison, de l'éclairement artificiel et de la mélatonine sur le rythme annuel de reproduction de la jument.

La plupart des mammifères des régions tempérées ou froides présentent une synchronisation naturelle des naissances de telle sorte que la majorité d'entre elles s'effectuent à la saison la plus favorable pour la survie du jeune. Les chevaux n'échappent pas à cette règle : dans les conditions naturelles, les poulains s'effectuent généralement à la fin du printemps.

La majorité des juments ont une période sans ovulation commençant vers octobre pour s'achever fin avril. La durée de cette phase d'inactivité dépend de l'âge de la jument et de son état physiologique. Elle est systématique et longue chez les juments de deux ou trois ans. Les juments adultes allaitant un poulain ne présentent pas d'anoestrus de lactation, mais l'inactivité ovarienne hivernale suivant cette lactation est plus marquée que chez les adultes n'ayant pas été suivies. Seulement la moitié des adultes non suivies présente cette phase d'inactivité (Palmer et Driancourt 1983). Comme pour les autres espèces de mammifères domestiques (I'Anson *et al* 1991), il semble que la jument

sous-alimentée ait une période d'inactivité allongée. Même sous des latitudes équatoriales, les juments présentent un rythme annuel de reproduction corrélé aux variations de la durée du jour bien que celles-ci soient faibles (Quintero *et al* 1994). La durée de l'inactivité dépend également de la race de la jument (Katila et Koskinen 1991).

Chez les juments ovariectomisées, il existe une variation saisonnière des taux de LH. Les taux moyens de LH sont voisins de zéro en hiver et de 30 ng/ml en été (Palmer et Guillaume 1992). Les variations des taux de FSH sont moins importantes.

L'effet de la lumière pour avancer la date de la première ovulation est connu depuis longtemps (Burkardt 1947, Nishikawa 1959). Le rôle de la phase journalière d'éclairement sur la reprise d'activité ovarienne a été étudié par divers auteurs (Sharp *et al* 1975, Palmer *et al* 1982, Malinowski *et al* 1985, Scraba et Ginther 1985). Palmer *et al* (1982) ont montré que, sur des juments préalablement sélectionnées en inactivité ovarienne, l'avance maximale de la

date de la première ovulation, sous nos latitudes, est obtenue avec 14h30 de lumière et 9h30 d'obscurité par jour. A plus de 16h et moins de 13h de lumière par jour, l'éclairement n'est pas stimulant.

Un traitement photopériodique de 14h30 de lumière par jour, commencé vers le solstice d'hiver et interrompu au bout de 35 jours suffit à avancer la date de la première ovulation de la même façon que si l'on maintient le traitement jusqu'aux jours longs naturels. Après cette interruption du traitement, aucune rechute en inactivité n'est constatée (Guillaume *et al* 1996).

Grâce à des relais nerveux complexes (noyaux suprachiasmatiques, Sharp *et al* 1984; ganglions cervicaux supérieurs, Sharp *et al* 1979), l'information "présence ou absence de lumière" est transmise à la glande pinéale qui, après stimulation noradrénergique (Sharp *et al* 1980a), sécrète de la mélatonine. L'ablation de la glande pinéale perturbe les variations saisonnières de la reproduction (Grubbaugh *et al* 1982).

Chez les Equidés, la mélatonine est sécrétée pendant toute la durée de la phase obscure (Sharp *et al* 1980b, Kilmer *et al* 1982, Colquhoun *et al* 1987, Guillaume et Palmer 1991). Cette sécrétion est nettement pulsatile (Sharp et Grubbaugh 1983). Les quantités de mélatonine produites journalièrement varient suivant la durée de la nuit, mais le taux de production reste constant dans le temps, de l'ordre de 0,7 ng/kg par minute, et ce pour des nuits d'une durée de 13h30 ou de 9h30 (Guillaume *et al* 1995a). La sécrétion de mélatonine s'adapte immédiatement à un changement de la durée de la nuit (Spadetta *et al* 1995). Un rythme endogène de sécrétion a été mis en évidence (Kilmer *et al* 1982, Guillaume *et al* 1997).

Une administration quotidienne de mélatonine par voie orale, 4 heures avant une nuit

courte, à des ponettes en inactivité ovarienne, supprime l'effet photostimulant des jours longs (Guillaume et Palmer 1991). Chez la jument, le même effet inhibiteur est obtenu lorsque la mélatonine est administrée oralement à plus faible dose (1,7 mg pour 250 kg) mais cette administration étant répétée 7 fois, une fois toutes les 2 heures (Guillaume et Palmer 1992) et ce quelle que soit la longueur ou la place de la nuit réelle, pendant la présence de taux élevés de mélatonine exogène. L'administration sous forme d'implants sous-cutanés retarde également la première ovulation annuelle (Guillaume *et al* 1995b). La mise au point de traitements de désaisonnement peut être envisagée en administrant la mélatonine le soir ou sous forme d'implants. En posant des implants de mélatonine aux alentours du solstice d'été, la dernière ovulation de l'année n'est pas avancée, mais la première ovulation de l'année suivante est significativement avancée de 2 mois par rapport à celle de juments témoins (Guillaume *et al* 1995b).

Stankov *et al* (1991) ont étudié la localisation des récepteurs de la mélatonine dans le cerveau des chevaux. Les quantités les plus élevées sont retrouvées dans la *pars tuberalis* et l'éminence médiane. Un nombre plus faible de ces récepteurs est décelable au niveau du noyau suprachiasmatique et de l'aire préoptique.

Conclusion

La baisse de l'activité reproductrice des Equidés durant l'hiver gêne considérablement les éleveurs. Il serait donc économiquement intéressant de maîtriser cette inactivité hivernale. Seule une meilleure connaissance des mécanismes physiologiques des rythmes tant journaliers qu'annuels contrôlant l'activité reproductrice peut conduire à cette maîtrise.

Références

- Burkardt J., 1947. Transition from anoestrous in the mare and the effect of artificial lighting. *J. Agric. Sci. Camb.*, 37, 64-68.
- Colquhoun K.M., Eckersall P.D., Renton J.P., Douglas T.A., 1987. Control of breeding in the mare. *Equine. Vet. J.*, 19, 138-142.
- Grubbaugh W., Sharp D.C., Berglund L.A., Macdowell K.J., Kilmer D.M., Peck L.S., Seamans K.W., 1982. Effects of pinealectomy in Pony mares. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 32, 293-295.
- Guillaume D., Palmer E., 1991. Effect of oral melatonin on the date of the first ovulation after ovarian inactivity of mares under artificial photoperiod. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 44, 249-257.
- Guillaume D., Palmer E., 1992. Lumière, mélatonine et reproduction chez la jument. *Ann. Zootech.*, 41, 263-269.
- Guillaume D., Rio N., Toutain P.L., 1995a. Kinetic studies and production rate of melatonin in pony mares. *American J. Physiol. : Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, R1236-R1241.
- Guillaume D., Duchamp G., Arnauld G., Camillo F., Palmer E., 1995b. Effect of melatonin implants on reproductive status of mares. *Biol. Reprod. Mono 1 Equine Reproduction*, VI, 435-442.
- Guillaume D., Duchamp G., Palmer E., 1996. 35 Jours Longs suffisent pour avancer et établir la cyclicité des juments après inactivité hivernale. 22e Journée de la Recherche Equine, 28 février 1996. Institut du Cheval, Paris.
- Guillaume D., Nagy P., Spadetta M., Duchamp G., Palmer E., 1997. Existence of an endogenous rhythm of melatonin secretion in mares. *International Congress on Chronobiology*, 7-11 septembre, Paris, France. *Chronobiology international* 14, 61 (Abst. 120).

- I'Anson H., Foster D.L., Foxcroft G.R., Booth P.J., 1991. Nutrition and reproduction. *Oxf. Rev. Reprod. Biol.*, 13, 239-311.
- Katila T., Koskinen E., 1991. Onset of luteal activity in different types of mares after winter anoestrus. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 44, 678-679.
- Kilmer D.M., Sharp D.C., Berglund L.A., Grubbaugh W., McDowell K.J., Peck L.S., 1982. Melatonin rhythms in Pony mares and foals. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 32, 303-307.
- Malinowski K., Johnson A.L., Scanes C.G., 1985. Effects of interrupted photoperiods on the induction of ovulation in anoestrous mares. *J. Anim. Sci.*, 61, 4, 951-955.
- Nishikawa Y., 1959. Studies on reproduction in horses. *Jap. Racing Ass.*, Tokio.
- Palmer E., Driancourt M.A., 1983. Some interactions of season of foaling, photoperiod and ovarian activity in the equine. *Livest. Prod. Sci.*, 10, 197-210.
- Palmer E., Guillaume D., 1992. Photoperiodism in the equine species - what is a long night ? *Anim. Reprod. Sci.*, 28, 21-30.
- Palmer E., Driancourt M.A., Ortavant R., 1982. Photoperiodic stimulation of the mare during winter anoestrous. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 32, 275-282.
- Quintero B., Manzo M., Diaz T., Verde O., Benachio N., Sifontes L., 1994. Reproductive behavior of thoroughbred mares in a tropical environment. 6th International Symposium on Equine Reproduction, August 7-13, Caxambu Minas Gerais Brazil, 111-112.
- Scraba S.T., Ginther O.J., 1985. Effects of lighting programs on onset of the ovulatory season in mares. *Theriogenology*, 24, 667-679.
- Sharp D.C., Grubbaugh W.R., 1983. Pulsatile secretion of melatonin during the scotophase in mares. *Biol. Reprod.*, 28, Abst. 136.
- Sharp D.C., Kooistra L., Ginther O.J., 1975. Effect of artificial light on the oestrus cycle of the mare. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 23, 241-246.
- Sharp D.C., Vernon M.W., Zavy M.T., 1979. Alteration of seasonal reproductive patterns in mares following superior cervical ganglionectomy. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 27, 1-7.
- Sharp D.C., Grubbaugh W., Berglund L.A., Seamans K.W., 1980a. Isoproterenol-stimulation of melatonin release in mares. *J. Anim. Sci.*, 51, Suppl. 1, Abst. 534.
- Sharp D.C., Grubbaugh W., Zavy M.T., Vernon M.W., 1980b. Seasonal variation in melatonin secretory patterns in mares. *J. Anim. Sci.*, 51, Suppl. 1, Abst. 535.
- Sharp D.C., Grubbaugh W.R., Gum G.C., Wirsig C.R., 1984. Demonstration of a direct retinohypothalamic projection in the mare. Society for the study of reproduction 17th annual meeting, July 23-26, University of Wyoming Laramie, Wyoming USA, Abst. 252.
- Spadetta M., Guillaume D., Palmer E., 1995. Immediate adaptation of melatonin secretion to light-dark cycle in equine species. *Biol. Rhythm Res.*, 26, 445.
- Stankov B., Cozzi B., Lucini V., Fumagalli P., Scaglione F., Fraschini F., 1991. Characterization and mapping of melatonin receptors in the brain of three Mammalian species : Rabbit, Horse and Sheep. *Neuroendocrinology*, 53, 214-221.

C. BRIANT

INRA-Haras
Nationaux, PRMD,
Equipe Reproduction
Equine, 37380 Nouzilly

e-mail :
christine.briant@tours.
inra.fr

Maîtrise de l'activité ovarienne chez la jument

Outre les traitements d'induction de la cyclicité saisonnière et de synchronisation des cycles pendant la période d'activité sexuelle, la maîtrise de l'activité ovarienne de la jument comprend également les techniques d'induction d'ovulation et de stimulation de la croissance folliculaire, dite superovulation. Nous présenterons tout d'abord les traitements d'induction d'ovulation car il sont bien maîtrisés ; cependant les plus efficaces, c'est-à-dire permettant d'induire l'ovulation dans le délai désiré et avec le minimum d'interventions chez l'animal, ne sont pas encore commercialisés en France. Les techniques de superovulation sont encore testées au plan expérimental.

L'induction de l'ovulation

L'induction pharmacologique de l'ovulation est obtenue par la production d'un pic de LH, soit d'origine exogène par injection d'hormones gonadotropes à activité LH, soit d'origine endogène par administration d'un analogue du GnRH.

L'administration des hormones gonadotropes se fait par injection unique intraveineuse lorsque le follicule dominant atteint la taille préovulatoire (30 à 40 mm). Le produit est considéré efficace s'il permet d'induire l'ovulation dans les 24 à 48 heures qui suivent l'injection. Associée au suivi ovarien par échographie trans-rectale, cette technique permet une programmation rationnelle des

inséminations. En France seule l'hCG (hormone chorionique humaine, 2500 UI par injection) est commercialisée ; mais son administration répétée sur un même animal entraîne la formation d'anticorps, associée à une baisse d'efficacité. Certains praticiens rapportent également l'observation de lutéolyse précoce.

Une alternative intéressante est fournie par l'injection de LH équine (1,5 mg par injection), produite à partir d'un extrait hypophysaire équin, qui n'est cependant disponible qu'à titre expérimental. Utilisée en routine à l'INRA de Nouzilly depuis 1987, cette technique permet d'induire une ovulation en 24 à 48 h chez plus de 85 % des juments traitées.

L'administration de peptides de synthèse analogues du GnRH peut s'effectuer sous deux formes pharmaceutiques différentes :

- la buséréline (commercialisée en France et utilisable également chez la vache) est injectée toutes les 12 heures, à partir du moment où le follicule dominant atteint la taille préovulatoire. L'administration intramusculaire de 40 µg par injection jusqu'à l'ovulation (3,8 injections en moyenne) permet d'obtenir 67 % d'ovulations dans les 48 heures (vs 20 % dans les 80 heures chez les témoins). L'administration intraveineuse de 20 µg par injection en 4 injections permet d'obtenir 83 % d'ovulations dans les 40 heures.

- le deslorelin est commercialisé en Australie et est utilisé dans d'autres pays, notamment aux Etats-Unis. C'est un implant sous-cutané, contenant 2,1 mg de principe actif, à libération de courte durée, qui est administré quand le follicule dominant atteint 35 mm. Son efficacité est semblable à celle des hormones gonadotropes (90 % d'ovulations dans les 48 heures), sa tolérance est bonne et il n'y a pas de perte d'activité dans le temps. Il n'est pas actuellement commercialisé en France.

Les traitements de superovulation

Ces traitements permettent d'induire, au cours d'un même cycle, la croissance de plusieurs follicules préovulatoires, qui doivent aboutir à la production de plusieurs embryons viables par cycle. Dans l'espèce équine, l'association de cette technique à celle du transfert d'embryons permettrait de proposer aux éleveurs un moyen d'augmenter la productivité des juments.

Chez la jument, espèce mono-ovulante, au cours de la phase folliculaire, la FSH endogène stimule l'émergence et la croissance des follicules qui sécrètent des quantités croissantes d'oestradiol et d'inhibine jusqu'à l'ovulation. L'inhibine est une protéine qui exerce un rétro-contrôle négatif sur la sécrétion de FSH hypophysaire. Quand le follicule dominant atteint environ 20 mm, la FSH endogène est fortement déprimée et seul le follicule dominant peut atteindre la taille préovulatoire et ovuler lors de la montée de LH.

Les traitements de superovulation consistent à compenser la dépression de la FSH

endogène, soit en injectant une hormone à activité FSH, soit en stimulant la production de FSH endogène par neutralisation de l'inhibine. L'immunisation anti-inhibine peut être active (vaccination anti-inhibine) ou passive (injection d'anticorps anti-inhibine).

Les gonadotrophines exogènes

Les hormones gonadotropes disponibles sur le marché, eCG (equine chorio-gonadotrophin, anciennement appelée PMSG) et FSH porcine ne sont pas efficaces chez la jument, du fait de la non adéquation hormones/récepteurs et seule la FSH équine permet d'obtenir une poly-ovulation.

Au plan expérimental des préparations de FSH obtenues à partir d'extraits hypophysaires équins sont testées depuis environ 15 ans. Ces préparations sont injectées quotidiennement par voie intramusculaire (0,75 mg de FSH) pendant la phase de croissance folliculaire. Elles permettent d'augmenter le nombre d'ovulations par cycle de façon répétable (2 à 4 ovulations/cycle traité vs 1/cycle témoin), mais l'augmentation du nombre d'embryons, collectés à 7 jours, varie selon les animaux et les cycles et n'est pas reproductible d'une expérience à l'autre (quelques expériences rapportent cependant l'obtention de 2 embryons/cycle traité vs 0,7/cycle témoin).

Différentes hypothèses sont proposées et actuellement testées : effet globalement nocif du traitement, contamination trop importante en LH, ovulation de mauvaise qualité, résorption embryonnaire précoce.

Il est certain qu'à plus long terme seul un produit répondant aux exigences du marché, hormone de synthèse ou recombinante, pourra être commercialisé.

L'immunisation anti-inhibine

Cette voie de recherche est intéressante parce qu'elle utilise les hormones endogènes. Des essais d'immunisation anti-inhibine chez la jument sont publiés depuis 1992. Cette technique permet d'augmenter le nombre d'ovulations (jusqu'à 4 en moyenne par cycle), cependant une seule publication mentionne la production d'embryons (1,6 embryon/cycle après immunisation active). Les travaux sur ce thème sont poursuivis, notamment pour mieux comprendre les mécanismes de régulation de la mono-ovulation.

Pour en savoir plus

Briant C., 1999. La superovulation chez la jument : point sur les techniques et débouchés potentiels. 25e journée de la recherche équine, Paris, Institut du cheval, DEFI, 3 mars 1999, 69-75.

Bruyas J.-F., Battut I., Trocherie E., Hecht S., Fieni F., Egron L., Tainturier D., 1996. Efficacité de la buséréline pour induire les ovulations chez la jument cyclée : essais de deux protocoles de traitement. 22e Journée de la recherche équine, Paris, Institut du cheval, 28 février 1996, 8-18.

Gaillot C., Guillaume D., Lecompte F., Combarous Y., 1994. Les gonadotrophines équine : de la connaissance fondamentale à l'élevage. 20e Journée de la recherche équine, Paris, CEREOPA, 2 mars 1994, 145-155.

Harrison L.A., Squires E.L., McKinnon A., 1991. Comparison of hCG, buserelin and luprostriol for induction of ovulation in cycling mares. *Equine Vet. Sci.*, 11, 163-166.

Mc Kinnon A., Figueroa S., Skidmore J., Vasey J.R., Trigg T., 1993. Predictable ovulation in mares treated with an implant of the GnRH analogue Deslorelin. *Equine Vet. J.*, 25, 321-323.

Mc Kinnon A., Vasey J., Lescun T., Trigg T., 1997. Repeated use of a GnRH analogue Deslorelin (Ovuplant) for hastening ovulation in the transitional mare. *Equine Vet. J.*, 29, 153-155.

N. GÉRARD

INRA-Haras
Nationaux, PRMD,
Equipe Reproduction
Equine, 37380 Nouzilly

e-mail :
nadine.gerard@tours.
inra.fr

Développement folliculaire terminal : évolution biochimique du follicule

Le développement folliculaire terminal regroupe l'ensemble des processus de croissance et de maturation du follicule dominant depuis sa sélection jusqu'à l'ovulation, ainsi que la régression (atréxie) des follicules dominés. Chez la jument, la sélection du follicule dominant a lieu au moins 6 jours avant l'ovulation, lorsque son diamètre atteint 15-20 mm. A la fin de la phase folliculaire, le follicule dominant atteint 40 mm de diamètre et acquiert la capacité à ovuler en réponse à une stimulation LH (endogène ou exogène). A ce stade, les événements impliqués incluent la maturation du complexe ovocyte-cumulus ainsi que la différenciation des cellules folliculaires (cellules de la granulosa et cellules de la thèque). Ces événements mènent à la rupture du mur folliculaire (ovulation), à la production d'un complexe ovocyte-cumulus mature, c'est à dire apte à être fécondé, et à la formation d'un corps jaune sécrétant de progestérone (lutéinisation).

Les hormones gonadotropes hypophysaires LH et FSH jouent un rôle essentiel dans le contrôle endocrinien du développement folliculaire, alors que les stéroïdes, les facteurs de croissance et autres facteurs peptidiques sont impliqués à un niveau local, comme facteurs paracrines ou autocrines, modulateurs de l'action des gonadotropines. A ce jour, les mécanismes physiologiques impliqués dans la régulation endocrine de la croissance et de la maturation folliculaire sont relativement bien connus, alors que les mécanismes locaux restent encore à déterminer pour la plupart. Une meilleure connaissance des constituants du fluide folliculaire et de l'activité des cellules folliculaires permettrait vraisemblablement de mieux comprendre, voire de résoudre certains des problèmes rencontrés dans l'espèce équine lors de la procréation assistée, au cours de la maturation et de la fécondation *in vitro*.

Cet article passe en revue les connaissances actuelles sur la composition du fluide

folliculaire équin et sur l'activité des cellules du follicule dans cette espèce.

Réceptivité aux hormones gonadotropes et stéroïdogénèse folliculaire

L'ovaire est le site majeur de synthèse de stéroïdes, qui sont le reflet de l'état physiologique des follicules. La présence de stéroïdes dans le fluide folliculaire de jument a été montrée dès 1960 (Short 1960), et la capacité stéroïdogène des cellules folliculaires a été décrite quelques années plus tard (Ryan et Short 1965). Dans l'espèce équine, la croissance du follicule dominant est caractérisée par l'augmentation intrafolliculaire des concentrations d'oestradiol-17 β et de progestérone (Fay et Douglas 1987, Sirois *et al* 1990, Gérard *et al* 1998, Gérard et Monget 1998), associée à l'augmentation du nombre de récepteurs à LH (Fay et Douglas 1987, Goudet *et al* 1999) et de l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse des stéroïdes. En fin de croissance, le follicule dominant présente une activité stéroïdogène maximale ; il produit une quantité abondante d'oestradiol-17 β . Celui-ci est un des signaux participant à l'augmentation des taux circulants de LH responsable de la maturation préovulatoire. Cette augmentation de la synthèse d'oestradiol-17 β au cours de la croissance folliculaire s'accompagne de l'augmentation de la quantité d'aromatase, enzyme de conversion des androgènes en oestrogènes. Cette maturation terminale, qui peut également être induite par injection de LH exogène, se caractérise par une baisse de la concentration intrafolliculaire d'oestradiol-17 β et une augmentation de la concentration de progestérone, accompagnées d'une baisse des taux d'expression des enzymes impliquées dans la synthèse des stéroïdes. A ces stades, les follicules dominés (vraisemblablement atrétiques) sont caracté-

risés par des faibles taux d'oestradiol-17 β et de progestérone, associés à des faibles taux d'expression des enzymes de la stéroïdogénèse. La régression du follicule dominant, parfois observée sur des cycles naturels chez la jument, est associée à de très faibles taux d'oestradiol-17 β et de très forts taux de progestérone. En plus du rôle endocrine et paracrine bien connu des stéroïdes, il a été récemment montré que la progestérone contenue dans le fluide folliculaire est capable d'induire la réaction acrosomique du spermatozoïde d'étalon et qu'elle active leur accrochage à la zone pellucide (Cheng *et al* 1998).

Autres molécules intrafolliculaires

Le liquide folliculaire est le produit, pour partie, d'un exsudat sérique mais il contient également des facteurs synthétisés localement, résultats de l'activité métabolique des cellules ovariennes.

La teneur en protéines totales du liquide folliculaire est supérieure à celle du plasma chez la jument, mais aucune corrélation n'a été observée avec la taille du follicule ou son état physiologique. Le contenu intrafolliculaire en protéines de haut poids moléculaire, telles que la fibronectine et l' α 2-macroglobuline, semble être corrélé à la taille du follicule (Gentry *et al* 1996).

Enzymes protéolytiques

Les enzymes protéolytiques jouent un rôle majeur dans la rupture du mur folliculaire au moment de l'ovulation. Il a été montré dans de nombreuses espèces que les protéines du système activateur du plasminogène sont à l'origine de la cascade protéolytique menant à la formation de plasmine et à l'activation des collagénases, aboutissant à la rupture du follicule. La concentration intrafolliculaire de relaxine, hormone peptidique connue pour moduler la production de procollagénase et de collagène dans divers tissus, n'est pas influencée par la taille folliculaire chez la jument (Ryan *et al* 1997), de même que l'activité du facteur VII et du fibrinogène. D'autre part, il a été montré que, dans cette espèce, le taux intrafolliculaire de facteur X augmente avec la taille folliculaire (Yamada et Gentry 1995). Aucune donnée ne concerne l'évolution de ces molécules au cours de la maturation préovulatoire du follicule.

Inhibine intrafolliculaire

L'inhibine du fluide folliculaire de jument, dont l'activité a été décrite pour la première fois dans les années quatre-vingt, est maintenant purifiée et caractérisée.

Facteurs de croissance et protéines porteuses

Les effets paracrines et autocrines des facteurs de croissance dans les follicules à antrum sont étudiés depuis quelques années.

Dans l'espèce équine, seule la concentration intrafolliculaire d'IGF-1 a été mesurée (Spicer *et al* 1991). Dans les fluides biologiques, les IGF sont fixés à des protéines de transport, les IGFBP, qui sont connues pour réguler l'activité des IGF en modulant leur disponibilité pour les cellules cibles. Dans de nombreuses espèces, dont l'espèce équine, le profil folliculaire des IGFBP est un bon indicateur de l'état physiologique du follicule (Gérard et Monget 1998).

Molécules de l'inflammation

L'ovulation peut être assimilée à une réaction inflammatoire locale et, dans de nombreuses espèces, elle se caractérise par l'augmentation de la concentration intrafolliculaire de certaines molécules impliquées dans le processus inflammatoire. Chez la jument, il y a une augmentation intrafolliculaire considérable de prostaglandines et de thromboxane B2 dans les heures qui précèdent l'ovulation, alors que les taux de leucotriènes et d'histamine restent inchangés (Watson et Sertich 1991). L'implication des prostaglandines dans le processus préovulatoire a été clairement montrée chez la jument et l'augmentation de l'expression de prostaglandine G/H synthase-2 au cours de la maturation préovulatoire a été récemment décrite dans cette espèce (Sirois et Doré 1997).

Autres molécules

Récemment, la présence d'une protéine de 200kDa a été mise en évidence dans les liquides et les cellules folliculaires au stade préovulatoire, en conditions naturelles ou après induction d'ovulation. Son expression dans le fluide folliculaire est corrélée à l'aspect du cumulus et au stade nucléaire de l'ovocyte (Gérard *et al* 1998). L'identité de cette protéine est inconnue.

D'autre part, en accord avec les données déjà observées dans le liquide folliculaire humain, la présence d'agents chémo-attractants pour le spermatozoïde a été montrée dans le liquide folliculaire équin (Navarro *et al* 1988). Ce signal chimique proviendrait de l'ovocyte mature ; sa nature moléculaire est inconnue.

Le rôle des glycosaminoglycannes dans le développement folliculaire et ovocytaire est très peu connu. Ils pourraient intervenir en régulant l'action des gonadotropines au niveau de l'ovaire et/ou la synthèse des stéroïdes. Dans l'espèce équine, la concentration intrafolliculaire en glycosaminoglycannes ne varie pas avec le stade du cycle (oestrus/dioestrus) et chute avec la taille des follicules (Santos *et al* 1995) ; cette faible concentration pourrait permettre l'expansion du cumulus au cours de la maturation folliculaire terminale.

Le profil et le contenu folliculaire en lipoprotéines a été étudié chez la jument (Le Goff 1994) mais aucune étude ne relate leur expression au cours du cycle, ou encore leur rôle sur la stéroïdogénèse folliculaire.

Conclusion

L'évolution biochimique du follicule est liée à son devenir (ovulation/atrésie). C'est au cours des processus de croissance et de maturation du follicule préovulatoire que se mettent en place les divers événements qui permettront la fécondation de l'ovocyte et les

premières étapes du développement embryonnaire. De ce fait, une meilleure connaissance de l'évolution biochimique de ce micro-environnement qu'est le follicule permettra de comprendre les mécanismes impliqués localement et de résoudre certains problèmes rencontrés lors de la manipulation des gamètes dans cette espèce.

Références

- Cheng F.P., Fazeli A.R., Voorhout W.F., Tremoleda J.L., Bevers M.M., Colenbrander B., 1998. Progesterone in mare follicular fluid induces the acrosome reaction in stallion spermatozoa and enhances in vitro binding to the zona pellucida. *Int. J. Androl.*, 21, 57-66.
- Fay J.E., Douglas R.H., 1987. Changes in thecal and granulosa cell LH and FSH receptor content associated with follicular fluid and peripheral plasma gonadotrophin and steroid hormone concentrations in preovulatory follicles of mares. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 35, 169-181.
- Gentry P.A., Zareie M., Liptrap R.M., 1996. Fibronectin concentrations correlates with ovarian follicular size and estradiol values in equine follicular fluid. *Anim. Reprod. Sci.*, 45, 91-102.
- Gérard N., Monget P., 1998. Intrafollicular insulin-like growth factor-binding protein levels in equine ovarian follicles during preovulatory maturation and regression. *Biol. Reprod.*, 58, 1508-1514.
- Gérard N., Duchamp G., Goudet G., Bézard J., Magistrini M., Palmer E., 1998. A high molecular weight preovulatory stage-related protein in equine follicular fluid and granulosa cells. *Biol. Reprod.*, 58, 551-557.
- Goudet G., Belin F., Bézard J., Gérard N., 1999. Intrafollicular content of luteinizing hormone receptor, a-inhibin, and aromatase in relation to follicular growth, estrous cycle stage, and oocyte competence for in vitro maturation in the mare. *Biol. Reprod.*, 60, 1120-1127.
- Le Goff D., 1994. Follicular fluid lipoproteins in the mare : evaluation of HDL transfer from plasma to follicular fluid. *Biochim. Biophys. Acta*, 1210, 226-232.
- Navarro M.C., Valencia J., Vazquez C., Cozar E., Villanueva C., 1988. Crude mare follicular fluid exerts chemotactic effects on stallion spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.*, 33, 321-324.
- Ryan K.J., Short R.V., 1965. Formation of estradiol by granulosa and theca cells of the equine ovarian follicle. *Endocrinology*, 76, 108-114.
- Ryan P.L., Klonisch T., Yamashiro S., Renaud R.L., Wasnidge C., Porter D.G., 1997. Expression and localization of relaxin in the ovary of the mare. *J. Reprod. Fert.*, 110, 329-338.
- Santos E.C.F., Varner D.D., Burghardt R.C., Forrest D.W., Blanchard T.L., 1995. Electrophoretic analysis of glycosaminoglycans from ovarian follicular fluid of mares. In : Sharp DC et Bazer FW (eds), *Equine Reproduction VI*, 393-401. Society for the study of Reproduction, Madison, WI.
- Short R.V., 1960. Steroids present in the follicular fluid of the mare. *J. Endocr.*, 20, 147-156.
- Sirois J., Doré M., 1997. The late induction of prostaglandin G/H synthase-2 in equine preovulatory follicles supports its role as a determinant of the ovulatory process. *Endocrinology*, 138, 4427-4434.
- Sirois J., Kimmich T.L., Fortune J.E., 1990. Developmental changes in steroidogenesis by equine preovulatory follicles : effects of equine LH, FSH, and CG. *Endocrinology*, 127, 2423-2430.
- Spicer L.J., Tucker K.E., Henderson K.A., Duby R.T., 1991. Concentrations of insulin-like growth factor-I in follicular fluid and blood plasma of mares during early and late oestrus. *Anim. Reprod. Sci.*, 25, 57-65.
- Watson E.D., Sertich P.L., 1991. Concentrations of arachidonate metabolites, steroids and histamine in preovulatory horse follicles after administration of human chorionic gonadotropin and the effect of intrafollicular injection of indomethacin. *J. Endocrinol.*, 129, 131-139.
- Yamada M., Gentry P.A., 1995. The hemostatic profile of equine ovarian follicular fluid. *Thrombosis Res.*, 77, 4 5-54.

De la collecte des ovocytes à la production d'embryons

C'est en 1989, à l'INRA de Nouzilly, que les premiers embryons équins issus de fécondation *in vitro* (FIV) ont été obtenus chez la jument. Depuis 10 ans, seuls 2 poulains sont nés après FIV (dans notre laboratoire) et 3 après injection intracytoplasmique de spermatozoïde (aux USA et en Australie). La production *in vitro* d'embryons dans l'espèce équine est encore bien loin d'être maîtrisée à ce jour, les taux de fécondation restent faibles comparés à ceux obtenus chez les autres espèces de mammifères. Les principaux facteurs responsables de ce lent développement sont : le petit nombre d'ovocytes disponibles à partir de juments d'abattoir ou d'animaux vivants, la qualité des ovocytes à la collecte et après maturation *in vitro*, encore non contrôlable à ce jour, et la grande difficulté à capiter *in vitro* les spermatozoïdes d'étalon. Des alternatives à la FIV sont proposées en utilisant le transfert d'ovocytes soit dans l'oviducte soit dans le follicule d'une jument receveuse.

Optimisation de la production d'ovocytes

Ces dernières années, l'optimisation de la production d'ovocytes par jument a été l'un des objectifs prioritaires pour la plupart des équipes de chercheurs. Face à la difficulté d'obtention de matériel d'abattoir, il a fallu se tourner vers la collecte des ovocytes sur animal vivant réalisée par ponctions des follicules. La ponction faite en aveugle à travers le flanc de l'animal ne permet de collecter que des ovocytes de follicules préovulatoires. Le développement et la maîtrise de la technique de ponction sous échographie transvaginale (Duchamp *et al* 1995), couramment utilisée dans l'espèce humaine, qui rend possible l'aspiration de gros et de petits follicules, a permis d'augmenter le nombre d'ovocytes collectés par jument.

La ponction des follicules peut être programmée en fonction du stade du cycle, du développement folliculaire et permet ainsi d'obtenir des populations d'ovocytes parfaitement caractérisées. Il est possible de réaliser des ponctions répétées chez un même animal sans risque d'adhérences et sans affecter aucunement la santé de l'animal ni la fertilité.

Le taux de collecte des ovocytes est influencé par la taille des follicules aspirés et par les systèmes utilisés. De 14 % à plus de 50 % d'ovocytes immatures sont collectés par petit follicule non préovulatoire et de 55 % à 80 % d'ovocytes matures sont aspirés par follicule préovulatoire de juments induites pour l'ovulation.

En moyenne, 3,2 ovocytes peuvent être collectés par ponction chez une jument en oestrus. La ponction du follicule préovulatoire,

35 heures après induction de l'ovulation, permet d'obtenir une moyenne de 0,8 ovocyte mature par cycle normal et 1,6 par cycle stimulé après traitement des juments aux hormones gonadotropes. Deux ponctions successives, au cours d'un même cycle, l'une en fin de phase folliculaire (oestrus) et l'autre en phase lutéale (dioestrus), donnent une moyenne de 8,9 ovocytes par jument : 0,9 ovocyte mature préovulatoire + 4 ovocytes immatures de la phase folliculaire + 4 ovocytes immatures de la phase lutéale.

Les juments gestantes peuvent être donneuses d'ovocytes sans que la gestation soit affectée. Une moyenne de 15 ovocytes par jument gestante est obtenue après 4 ponctions successives entre 40 et 75 jours de gestation.

Aptitude des ovocytes à la maturation

À la collecte, les ovocytes sont entourés de cellules formant un cumulus soit compact, soit expansé, en proportions variables selon l'origine et le moment du cycle à la ponction : plus de 90 % d'ovocytes à cumulus compact sont collectés sur animal vivant en oestrus ou en dioestrus alors qu'ils ne sont que de 50 à 80 % à partir d'ovaires d'abattoir. La plupart des ovocytes à cumulus compact sont immatures et présentent différents aspects de structure de chromatine : diffuse, filamenteuse ou regroupée en une masse dense. Cette dernière structure semblerait être associée avec la capacité des ovocytes à mûrir, mais aucune preuve n'a été apportée jusqu'à ce jour.

La maturation *in vivo* des ovocytes de jument a été suivie après ponction de follicules préovulatoires à différentes périodes après l'induction de l'ovulation. L'étude de la chronologie des événements de maturation a montré que le cumulus des ovocytes, encore compact au moment de l'induction, devient expansé entre 6 et 12 h après induction. La reprise de la méiose se fait progressivement : 24 h après induction tous les ovocytes sont en métaphase I, 35 h après induction (juste avant l'ovulation) ils sont en métaphase II, stade nucléaire indispensable pour une fécondation ultérieure (Bézar *et al* 1997).

La maturation *in vitro* des ovocytes collectés immatures est influencée par l'aspect du cumulus, la taille du follicule, le stade physiologique à la collecte, l'atrésie folliculaire, les milieux de culture utilisés et la durée de culture. Le taux de maturation *in vitro* est de 45 à 75 % après 30 h de culture dans un milieu simple avec sérum et hormones. L'addition seule d'EGF (Epidermal Growth Factor) au milieu TC199 n'induit pas la maturation nucléaire comme chez les bovins (6 % vs 80 %,

J. BÉZARD

INRA-Haras
Nationaux, PRMD,
Equipe Reproduction
Equine, 37380 Nouzilly

e-mail :
jacqueline.bezard@
tours.inra.fr

respectivement). Toutefois, il a été montré que l'EGF peut être utilisé comme substitut aux hormones gonadotrophines couramment utilisées dans les milieux de maturation (Goudet *et al* 1998) et que le sérum de veau foetal reste indispensable pour maturer les ovocytes chez la jument. Plus de la moitié des ovocytes aspirés de follicules de diamètre inférieur à 10 mm sont incapables de maturer *in vitro*. Les ovocytes de follicules atrétiques sont plus aptes à maturer *in vitro* que ceux provenant de follicules sains, mais leur aptitude à la fécondation n'a pas été démontrée.

La maturation cytoplasmique est indispensable au développement ultérieur du jeune embryon. Cette maturation n'est pas maîtrisée à ce jour, seule l'étude de modifications morphologiques et biochimiques liées à la maturation finale des ovocytes chez la jument a été abordée. Au cours de la maturation, la zone pellucide subit des transformations de structure. L'interaction entre la zone pellucide et les spermatozoïdes a été montrée comme pouvant refléter l'état fonctionnel des ovocytes. Ainsi, les ovocytes immatures fixent moins de spermatozoïdes que les ovocytes maturés *in vivo* ou *in vitro*.

Aptitude des ovocytes à produire des embryons

La fécondation *in vitro* (FIV) n'est pas utilisable à ce jour pour évaluer la qualité des ovocytes maturés *in vitro* à produire des embryons viables. Malgré la naissance de deux poulains FIV, issus d'ovocytes maturés *in vivo* et inséminés avec du sperme capacité au ionophore, le taux de segmentation reste faible (23 à 30 %) et il en est de même des ovocytes maturés *in vitro*. L'utilisation de caféine ou d'héparine comme traitement de capacitation n'a pas amélioré les résultats. Aucune gestation n'a été obtenue après transfert d'embryons issus d'ovocytes maturés *in vitro*.

La méthode de FIV conventionnelle chez la jument ne semble plus à l'étude ces dernières années. De nouvelles techniques de procréation assistée sont en cours de mise au point.

Alternatives à la fécondation *in vitro*

Suite aux échecs de la FIV, des transferts d'ovocytes d'une donneuse dans l'oviducte (GIFT : gamete intrafallopian transfer) ou dans le follicule (TOIF : transfert d'ovocyte intrafolliculaire) d'une jument receveuse inséminée ont été tentés pour fécondation *in vivo*.

Le transfert d'ovocyte dans l'oviducte est actuellement utilisé dans certains centres spécialisés pour fécondation *in vivo* aux USA. Le transfert dans l'oviducte de la receveuse d'ovocytes matures ponctionnés *in vivo* est réalisé par voie chirurgicale. Les taux de gestation sont comparables à ceux obtenus après transfert classique d'embryons. L'âge de la donneuse d'ovocytes a une influence sur la formation de vésicules embryon-

naires : 92 % et 31 % de vésicules embryonnaires ont été obtenus à partir d'ovocytes de juments âgées respectivement de moins de 10 ans et de plus de 20 ans. Récemment, il a été montré que des ovocytes collectés *in vivo* (24h après hCG) à un stade de pré-maturation (métaphase I) et mis en culture (de 12 à 20 h) pour atteindre une maturation finale (métaphase II) avant leur transfert dans l'oviducte, étaient capables de produire des embryons (Hinrichs *et al* 1998).

Le transfert d'ovocyte intrafolliculaire est possible à réaliser en aveugle à travers le flanc de l'animal. Des gestations multiples ont été obtenues après transfert de plusieurs ovocytes soit matures, soit immatures dans un follicule receveur. Des gestations simples ont résulté de transfert d'un ovocyte mature d'une jument donneuse dans un follicule pré-ovulatoire d'une jument receveuse dont le propre ovocyte avait été enlevé. La ponction folliculaire effectuée sous échographie transvaginale, qui permet de visualiser l'aiguille dans le follicule, améliore cette méthode. L'analyse de la filiation des embryons, obtenus après transfert d'un ovocyte dans un follicule qui garde son propre ovocyte, a permis de contrôler les origines maternelles. Ainsi, 50 % des ovocytes transférés sont capables de produire un embryon et 81 % des propres ovocytes du follicule receveur donnent un embryon. La mule est un bon modèle pour le transfert intrafolliculaire d'un ovocyte de donneuse car son propre ovocyte est infécond : la gestation obtenue ne peut donc provenir que de l'ovocyte transféré. Une gestation a déjà été obtenue en 1997 dans notre laboratoire, gestation interrompue volontairement afin de confirmer l'origine maternelle de l'embryon (Palmer *et al* 1997).

Cette méthode, non chirurgicale, semble prometteuse pour augmenter le nombre d'embryons nécessaires à la recherche mais aussi pour obtenir des embryons de juments ayant des problèmes de reproduction.

Pour en savoir plus

Bézar J., Magistrini M., Battut I., Duchamp G., Palmer E., 1992. Fécondation *in vitro* chez les Equidés. Recueil de Médecine Vétérinaire, Spécial reproduction des Equidés, 168, 11/12, 993-1003.

Bézar J., Mekarska A., Goudet G., Duchamp G., Palmer E., 1997. Timing of *in vivo* maturation of equine preovulatory oocytes and competence for *in vitro* maturation of immature oocytes collected simultaneously. Equine Vet. J., Suppl. 25, 33-37.

Duchamp G., Bézar J., Palmer E., 1995. Oocyte yield and the consequences of puncture of all follicles larger than 8 millimeters in mares. Biol. Reprod. Mono 1, 233-241.

Goudet G., Belin F., Mlodawska W., Bézar J., 1998. Influence of Epidermal Growth Factor on *in vitro* maturation of equine oocytes. 7th International Symposium on Equine Reproduction. University of Pretoria, South Africa.

Hinrichs K., Betschart R.W., McCue P.M., Squires E.L., 1998. Effect of time of follicle aspiration on pregnancy rate after oocyte transfer in the mare. 7th International Symposium on Equine Reproduction. University of Pretoria, South Africa.

Palmer E., Magistrini M., Bézard J., Duchamp G., 1991. Gestation après fécondation *in vitro* dans l'espèce équine. C. R. Acad. Sci., 310, 71.

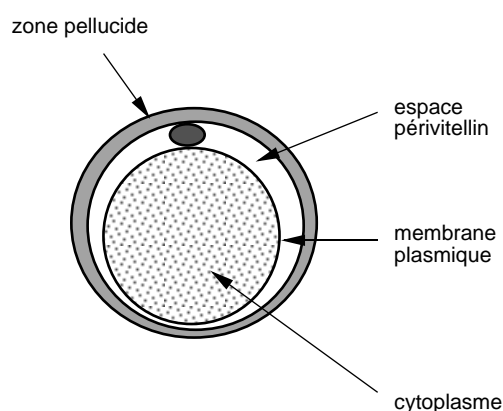
Palmer E., Duchamp G., Cribiu E.P., Mahla R., Boyazoglu S., Bézard J., 1997. Follicular fluid is not a compulsory carrier of the oocyte at ovulation in the mare. Equine Vet. J., Suppl. 25, 22-24.

Micromanipulation des gamètes

Les succès limités en fécondation *in vitro* (FIV) conventionnelle chez les équins ont incité à développer d'autres techniques de reproduction assistée, basées sur la micromanipulation des gamètes. Les échecs en FIV conventionnelle seraient dus à une dureté de la zone pellucide de l'ovocyte, probablement induite par la maturation *in vitro* et empêchant le spermatozoïde de pénétrer dans l'ovocyte, et à la nécessité d'avoir une méthode de capacitation des spermatozoïdes efficace pour qu'ils puissent pénétrer dans l'ovocyte. Les techniques dites de procréation assistée permettent de contourner ces deux problèmes.

Toutes ont pour objectif d'aider le spermatozoïde à pénétrer dans l'ovocyte. Lors de la fécondation, le spermatozoïde doit franchir deux barrières ovocytaires : la zone pellucide puis la membrane plasmique (figure 1). Plusieurs techniques l'aident à franchir la zone pellucide, une autre technique l'aide à franchir les deux barrières.

Figure 1. Ovocyte.



Principes

Deux des techniques, PZD (partial zona dissection) et ZD (zona drilling), consistent à faire une brèche dans la zone pellucide, soit mécaniquement (PZD), soit chimiquement (ZD). Les ovocytes sont ensuite mis à incuber avec des spermatozoïdes dans un tube : un ou des spermatozoïde(s) peuvent alors entrer dans l'espace périvitellin (figure 2).

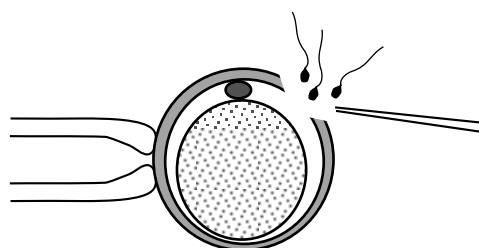
Auparavant, les spermatozoïdes doivent tout de même être traités par un agent capacitant.

La technique appelée SUZI (subzonal sperm injection) consiste à déposer un ou plusieurs spermatozoïdes mobiles à l'aide d'une pipette dans l'espace périvitellin. Le ou les spermatozoïdes choisis par l'opérateur n'ont plus que la membrane plasmique à franchir (figure 2). Comme pour les deux techniques précédentes, les spermatozoïdes doivent être capcités.

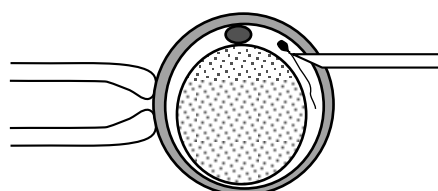
Ces trois techniques, PZD, ZD et SUZI, nécessitent de disposer de spermatozoïdes mobiles et fécondants (capables de fusionner avec l'ovocyte). Un des problèmes rencontrés

Figure 2. Principes des différentes techniques.

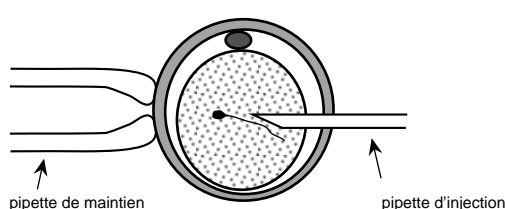
PZD (partial zona dissection) et ZD (zona drilling)



SUZI (subzonal sperm injection)



ICSI (intracytoplasmic sperm injection)



F. GUIGNOT

INRA-Haras
Nationaux, PRMD,
Equipe Reproduction
Equine, 37380 Nouzilly

e-mail : florence.
guignot@tours.inra.fr

est le taux élevé de polyspermie (pénétration de plus d'un spermatozoïde dans l'ovocyte), qui bloque ensuite le développement (PZD et SUZI : 15 à 40 % de polyspermie ; ZD : 40 à 60 %).

La technique ICSI (intracytoplasmic sperm injection) consiste à déposer un spermatozoïde directement dans le cytoplasme de l'ovocyte (figure 2). Elle a été utilisée avec succès en médecine humaine dans des cas de stérilité masculine (Palermo *et al* 1992 et 1993, Van Steirteghem *et al* 1993). Dans les espèces domestiques, les premières naissances d'animaux issus d'ICSI ont été obtenues chez le bovin en 1991, et chez le mouton en 1996. Dans l'espèce équine, le premier poulain issu d'ICSI est né en 1996, après transfert chirurgical dans l'oviducte d'un oeuf clivé, 3 jours post ICSI, résultat de la microinjection de 4 ovocytes collectés sur des ovaires d'abattoir et maturés *in vitro* (Squires *et al* 1996).

Cette technique n'implique apparemment aucun traitement particulier des spermatozoïdes avant microinjection. De plus, il n'y a aucun risque de polyspermie.

Réalisation

Les différentes techniques nécessitent un appareillage spécifique. Le microscope doit être équipé de micromanipulateurs permettant de réduire tous les mouvements de l'opérateur. Des micropipettes spécifiques à chaque technique sont également nécessaires : il faut une pipette de maintien au bout arrondi et de diamètre équivalent à celui d'un ovocyte (environ 100 µm), au bout de laquelle l'ovocyte sera maintenu par aspiration, et une pipette beaucoup plus fine, pointue, de diamètre inférieur à 10 µm, pour injecter le spermatozoïde (SUZI, ICSI) ou trouser la zone pellucide (PZD).

La technique d'ICSI, actuellement majoritairement utilisée, est, pour l'espèce équine, largement inspirée de celle utilisée en médecine humaine. Une goutte de sperme est déposée dans une goutte de polyvinylpyrrolidone (PVP) à 8 % pour ralentir le mouvement des spermatozoïdes. A l'aide de la pipette d'injection, le mouvement du spermatozoïde choisi par l'opérateur est arrêté définitivement, en lésant le flagelle au niveau de la pièce intermédiaire. Ensuite, le spermatozoïde est aspiré, flagelle le premier, dans la pipette d'injection : il est alors prêt à être microinjecté dans l'ovocyte. Après avoir placé l'ovocyte contre la pipette de maintien, la pipette d'injection, biseautée pour bien pénétrer dans l'ovocyte, est introduite dans celui-ci à l'opposé de la pipette de maintien, et le spermatozoïde est refoulé dans le cytoplasme de l'ovocyte. L'ovocyte microinjecté est ensuite mis en culture. Si tout s'est bien passé, les premiers clivages doivent survenir deux jours après microinjection. Apparaissent ensuite, 5 à 6 jours après microinjection, de jeunes embryons au stade morula (plus de 16 cellules) qui correspond au stade de développement trouvé dans l'oviducte, voire même, 7 à 8 jours après microinjection, des blastocystes (embryon un peu plus âgé, plus de 180 à 200

cellules) qui correspondent à des stades trouvés dans l'utérus.

Les techniques de procréation assistée nécessitent un temps d'apprentissage non négligeable, notamment l'ICSI qui est la plus délicate de toutes, mais qui donne à l'heure actuelle les résultats les plus intéressants.

Résultats

PZD, ZD, SUZI

Le taux de pénétration des spermatozoïdes dans les ovocytes est plus élevé après PZD (12 %, n = 58) que si la zone pellucide est intacte (4 %, n = 57). Un taux de clivage relativement élevé, de 30 à 80 % en fonction du traitement de capacitation appliqué, a été obtenu après ZD. Ces deux techniques ont permis l'obtention de jeunes embryons (morulae) de plus de 50 cellules : 5 après PZD (n = 55 tentatives, Azuma *et al* 1995) et 5 après ZD (n = 11, Li *et al* 1995). Après SUZI, Meintjes *et al* (1996) ont obtenu un taux de clivage de 6 % et une seule morula (> 16 cellules, n = 32).

ICSI

Cette technique permet d'augmenter significativement le taux de fécondation après maturation *in vitro* par rapport à la FIV classique (44,7 % vs 22,3 %). Après ICSI, il y a augmentation du taux de clivage des oeufs microinjectés si ceux-ci sont maturés *in vitro* avec du liquide folliculaire (48,4 %) plutôt qu'avec du sérum de jument en chaleur (4,2 %). Un taux de clivage identique (46 %, n = 76) a pu être obtenu après activation des oeufs microinjectés avec un agent calcique, l'ionophore A23187. L'ICSI a permis d'obtenir : 1/ à partir d'ovocytes ponctionnés sur des juments gestantes et de sperme capacité, 3 morulae (> 16 cellules, sur 36 essais, Meintjes *et al* 1996), 2/ à partir d'ovocytes d'abattoir et de sperme capacité ou non, 6 morulae (> 16 cellules) et 1 blastocyste (sur 31 essais, Dell'Aquila *et al* 1997) et 3 morulae (23, 50 et > 80 cellules, sur 76 essais, Guignot *et al* 1998).

Développement in vitro des embryons

Dans l'espèce équine, le taux de développement *in vitro* des jeunes embryons obtenus après procréation assistée est encore faible, malgré l'amélioration du taux de clivage obtenue après ICSI. Des travaux de recherche s'orientent vers les différents milieux de culture à utiliser pour l'améliorer. Des concentrations croissantes de glucose dans le milieu de culture (0,5 mm de 1 à 4 jours, puis 5,5 mm de 5 à 8 jours de culture) semblent avoir un effet positif sur le taux de développement embryonnaire après PZD. Dans d'autres espèces (humaine, bovine, souris), des systèmes de co-culture ont été utilisés avec succès pour augmenter ce taux de développe-

ment, notamment en cultivant les oeufs clivés sur des tapis de cellules Véro (cellules de rein de singe). Ces cellules secrèteraient des substances bénéfiques pour la croissance de l'embryon et pourraient également jouer le rôle de détoxifiant du milieu de culture.

Chez le cheval, après ICSI, les stades de développement embryonnaire les plus avancés ont été obtenus après 5,5 jours de co-culture sur tapis de cellules d'oviductes bovins (morulae, > 16 cellules, Meintjes *et al* 1996) et après une semaine de co-culture sur tapis de cellules Véro (morulae et 1 blastocyste, Dell'Aquila *et al* 1997 ; 1 morula, > 80 cellules, Guignot *et al* 1998). Les transferts intra-utérins de ces embryons n'ont à ce jour conduit à aucune gestation. Les seuls poulains obtenus après procréation assistée proviennent de transfert d'oeufs clivés après ICSI, cultivés au maximum 3 jours *in vitro*, et transférés à un stade de développement très précoce (< 16 cellules), par voie chirurgicale, dans l'oviduc-

te d'une jument receveuse (un poulain sur un transfert, Squires *et al* 1996 ; 2 poulains sur 14 transferts, McKinnon *et al* 1998 ; 2 poulains sur 12 transferts, Cochran *et al* 1998). Les seuls transferts intra-utérins d'embryons cultivés *in vitro* qui ont donné des naissances ont été réalisés à partir d'embryons issus de fécondation *in vivo* et collectés dans les oviductes, 2 jours après l'ovulation, au stade 4-8 cellules, puis mis en culture *in vitro* pendant 5 jours.

Conclusion

Les techniques de procréation assistée, notamment l'ICSI, semblent prometteuses, mais des recherches sont encore à poursuivre sur le développement des embryons jusqu'à 6 jours, stade auquel on peut transférer l'embryon directement dans l'utérus. Ce n'est qu'ensuite que l'on pourra envisager son application sur le terrain.

Références

- Azuma T., Choi Y.H., Hochi S., Oguri N., 1995. Effect of glucose in the culture medium on development of horse oocytes matured and microfertilized in vitro. *Reprod. Fert. Dev.*, 7, 1067-1071.
- Cochran R., Meintjes M., Reggio B., Hylan D., Carter J., Pinto C., Paccamonti D., Golke R.A., 1998. Live foals produced from sperm-injected oocytes derived from pregnant mares. *J. Equine Vet. Sci.*, 18, 736-740.
- Dell'Aquila M.E., Cho Y.S., Minoia P., Traina V., Lacalandra G.M., Maritato F., 1997. Effects of follicular fluid supplement of in-vitro maturation medium on the fertilization and development of equine oocytes after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 12, 2766-2772.
- Guignot F., Ottogalli M., Yvon J.M., Magistrini M., 1998. Preliminary observations in in vitro development of equine embryo after ICSI. *Reprod. Nutr. Dev.*, 38, 653-663.
- Li L.Y., Meintjes M., Graff K.J., Paul J.B., Denniston R.S., Godke R.A., 1995. In vitro fertilization and development of in vitro-matured oocytes aspirated from pregnant mares. *Biol. Reprod. Mono.* 1, 309-317.
- McKinnon A.O., Lacham-Kaplan O., Trounson A.O., 1998. Pregnancies produced from fertile and infertile stallions by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of single frozen / thawed spermatozoa into in vivo matured mare oocytes. 7th Int. Symp. Equine Reprod., 137 (abstr.).
- Meintjes M., Graff K.J., Paccamonti D., Eilts B.E., Cochran R., Sullivan M., Fall H., Godke R.A., 1996. In vitro development and embryo transfer of sperm-injected oocytes derived from pregnant mares. *Therio.*, 45, 304.
- Palermo G.D., Joris H., Devroey P., Van Steirteghem A.C., 1992. Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. *The Lancet*, 340, 17-18.
- Palermo G.D., Camus M., Joris H., Devroey P., Derde M.P., Van Steirteghem A.C., 1993. Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 59, 826-835.
- Squires E.L., Wilson J.M., Kato H., Blaszczyk A., 1996. A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured in vitro. *Therio.*, 45, 306.
- Van Steirteghem A.C., Nagy Z., Joris H., Liu J., Staessen C., Smits J., Wisanto A., Devroey P., 1993. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 8, 1061-1066.

D. LAGNEAUX,
G. DUCHAMP

INRA-Haras
Nationaux, PRMD,
Equipe Reproduction
Equine, 37380 Nouzilly

e-mail :
daniel.lagneaux@tours.
inra.fr

Le transfert d'embryons chez les équidés

Après les premiers transferts d'embryons équinés réalisés par Oguri et Tsutsumi (1972), la mise au point d'une technique codifiée non chirurgicale de collecte et de transfert des embryons est disponible pour l'espèce équine (Lagneaux 1999). Il est possible d'obtenir des gestations par transfert d'embryons dont les mères sont des juments âgées mais de haute valeur génétique ou commerciale, et aussi des mères poursuivant leur carrière sportive. Le transfert d'embryon permet d'augmenter la production de juments d'élite par récoltes et transferts répétés.

Les transferts d'embryons frais

Les résultats varient selon les équipes et en fonction des techniques pratiquées (Bruyas et Lagneaux 1992) et des races utilisées (Lagneaux et Palmer 1989). Le taux de collecte dépend de la fertilité de la jument donneuse et de l'étalon utilisé. Le taux de gestation dépend de la qualité de la jument receveuse, de son degré de synchronisation avec la jument donneuse, mais aussi de la qualité intrinsèque de l'embryon. En France, depuis 1986, 490 juments différentes ont bénéficié de cette technique. Pour chaque jument donneuse ayant au moins une porteuse gestante, le nombre moyen de poulains obtenus par transfert est de 1,7 par an. Les résultats récents des Haras Nationaux donnent un taux de collecte de 40-50 % et un taux de gestation à 15 jours par embryon transféré de 65 % (Lagneaux 1999).

Le degré de synchronisation entre donneuse et receveuse est un facteur de réussite essentiel, des solutions palliatives permettent de contourner cette contrainte comme l'utilisation de receveuses ovariectomisées ou en anoestrus pour lesquels un traitement suppléatif à base de progestatifs est nécessaire.

Embryons réfrigérés

La réfrigération des embryons, encore très peu utilisée en France, permet (en particulier aux Etats-Unis) de transporter des embryons dans un milieu de culture (Ham F10) à l'aide d'un container thermostaté (à 4°C) du lieu de récolte au lieu de présence de la porteuse. La remise en place, ainsi différée de 24 à 48 heures, est réalisée avec un taux de réussite comparable à celui qui est obtenu lors de transferts des embryons frais.

La congélation des embryons

Cette technique permet de dissocier dans le temps et dans l'espace les récoltes et les transferts d'embryons. La première congélation réussie d'embryons équinés a été réalisée par Yamamoto *et al* (1982). Des travaux préli-

minaires ont montré l'importance du diamètre de l'embryon à la congélation : seuls les petits embryons - stade morula ou jeune blastocystes - sont congelables.

Le protocole de congélation des embryons équinés est d'inspiration bovine. Il nécessite l'emploi d'un cryoprotecteur (généralement du glycérol). Le refroidissement de l'embryon se fait par étapes : de 3 °C/min jusqu'à -7 °C, à -7 °C seeding (terme anglais signifiant "ensemencement" : il s'agit d'un acte technique permettant d'initier - ensemençer le premier cristal de glace dans un milieu liquide pour obtenir sa cristallisation) puis de 0,3 °C/min jusqu'à -30 °C, enfin stockage dans l'azote liquide à -196 °C. La décongélation est rapide dans un bain-marie à 37 °C, pendant 30 secondes. Le nécessaire retrait du cryoprotecteur s'effectue par lavages successifs dans différents bains à concentrations décroissantes. Le saccharose utilisé comme additif lors du retrait du cryoprotecteur prévient les risques d'éclatement cellulaire (Lagneaux *et al* 1997).

Les résultats obtenus après transfert d'embryons congelés-décongelés sont actuellement inférieurs à ceux obtenus lors du transfert d'embryons frais : moins de 40 % (synthèse de Squires *et al* 1999) vs 65-70 %, même si de tout récents résultats permettent d'espérer des progrès intéressants.

Les critères de qualité de l'embryon

Si la morphologie (Betteridge *et al* 1982) ou la physiologie (Wilson *et al* 1986) de l'embryon équin sont connues, l'appréciation de sa qualité, plus délicate, peut être abordée par plusieurs tests actuellement disponibles : l'analyse morphologique (Squires et Garcia 1985) trop subjective, l'analyse histologique, fiable mais irréversible... Une étude comparant deux méthodes d'analyse : mesure du métabolisme embryonnaire et fluorescence des cellules mortes marquées au DAPI (Huhtinen *et al* 1995) a permis de montrer la fiabilité de ces deux tests indépendants. Ainsi, le test de marquage au DAPI, fiable, efficace, n'est pas préjudiciable pour l'embryon, puisque des gestations, des poulinaiges et des poulains totalement sains ont été obtenus avec des embryons préalablement testés (Huhtinen *et al* 1997, Lagneaux *et al* 1997). Ce test est un outil indispensable pour tout progrès de recherche sur l'embryon.

Perspectives

Par une méthode expérimentale originale et récente, un taux de gestation de 60 % après décongélation d'embryons préalablement congelés avec 100 mM de glutamine a été obtenu.

Si la congélation est la préoccupation prin-

cipale des équipes travaillant dans le domaine de la transplantation embryonnaire équine, d'autres orientations existent : plus pratiques, telles que la qualité des milieux de collecte, les critères de choix des receveuses (Camillo *et al* 1997), ou plus fondamentales comme la différenciation des cellules embryonnaires, les mécanismes de descente embryonnaire, la reconnaissance materno-foetale ou encore l'expression génétique.

Depuis 1986, plus de 500 poulains sont nés en France grâce à la transplantation embryonnaire. Le développement de cette technique reste limité en raison de son coût élevé et des lourdes contraintes techniques. La mise au point d'une technique fiable de congélation des embryons associée à un traitement efficace de super-ovulation sont les objectifs principaux des thèmes de recherches. Le test d'appréciation de la qualité des embryons, un outil efficace, doit permettre d'accélérer l'obtention de progrès significatifs. Enfin il faudra savoir réserver cette technique à la production de qualité en évitant la course à l'augmentation de la quantité ; la transplantation embryonnaire restera alors ce qu'elle est dans les autres espèces animales : un outil de production pour reproducteurs "haut de gamme".

Pour en savoir plus

Betteridge K.J., Eaglesome M.D., Mitchell D., Flood P.F., Beriault T.R., 1982. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation : observations on fresh specimens. *J. Anat.*, 135, 191-209.

Bruyas J.F., Lagneaux D., 1992. Transplantation embryonnaire équine. *Rec. Med. Vet.*, 168, 11-12, 937-946.

Camillo F., Cela M., Vannozzi I., Romagnoli S., Aria G., 1997. Use of early pregnant mares as embryo recipients. *Equine Vet. J., Suppl.* 25, 77-79.

Colchen S., Battut I., Fieni F., Tainturier D., Bruyas J.F., 1998. Quantitative analysis and histological morphology of equine embryos at exactly 156 and 168 hours after ovulation. 7th I.S.E.R. Pretoria (abstract 141-142).

Hinrichs K., Sertich P.L., Palmer E., Kenney R.M., 1987. Establishment and maintenance of pregnancy after embryo transfer in ovariectomized mares treated with progesterone. *J. Reprod. Fert.*, 80, 395-401.

Huhtinen M., Bredbacka P., Kotilainen T., 1995. Non surgical transfer of 4',6'-Diamidino-2-Phenylindole-stained Equine demi-embryos treated with cytocholasin B and Nocodazole. *Biol. Reprod. Mono* 1, 325-328. Huhtinen M., Lagneaux D., Koskinen E., Palmer E., 1997. The effect of sucrose in the thawing solution on the morphology and mobility of frozen equine embryos. *Equine Vet. J., Suppl.* 25, 94-97.

Lagneaux D., 1999. Transfert d'embryons - aspects techniques. 25e Journée d'étude de la Recherche Equine - 61-67, DEFI -Paris.

Lagneaux D., Palmer E., 1989. Are pony and larger mares similar as recipients for non-surgical transfer of Day 7 embryos ? *Equine Vet. J., Suppl.* 8, 64-67.

Lagneaux D., Palmer E., 1993. Embryo transfer in anoestrus recipient mares : attempts to reduce altrenogest administration period by treatment with pituitary extract. *Equine Vet. J., Suppl.* 15, 107-110.

Lagneaux D., Huhtinen M., Koskinen E., Palmer E., 1997. Effect of anti-freeze protein (AFP) on the cooling and freezing of equine embryos as measured by DAPI-staining. *Equine Vet. J., Suppl.* 25, 85-87.

Oguri N., Tsutsumi Y., 1972. Non-surgical recovery of equine eggs, and an attempt at non-surgical egg transfer in horses. *J. Reprod. Fert.*, 31, 187-195.

Squires E.L., Garcia R.H., 1985. Factors affecting success of equine embryo transfer. *Equine Vet. J., Suppl.* 3, 92.

Squires E.L., Mc Cue P.M., Vanderwall D., 1999. The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology*, 51, 91-104.

Wilson J.M., Caceci T., Kraemer D.C., Potter G.D., Neck K.F., 1986. Hatching of the equine embryo : an electron microscopy study. *Biol. Reprod.*, 34, Suppl. 1, 101.

Yamamoto Y., Oguri N., Tsutsumi Y., Hachinohe Y., 1982. Experiments in the freezing and storage of equine embryos. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 32, 399-403.

Endocrinologie de l'étalon

Dans beaucoup d'espèces de mammifères, dont le cheval, le déroulement de la spermatogénèse dépend du bon fonctionnement de l'axe hypothalamus-hypophyse-testicule. Celui-ci repose sur des mécanismes de stimulation de l'hypothalamus qui, par le GnRH qu'il sécrète, agit sur l'hypophyse. Les hormones hypophysaires (LH, FSH) vont à leur tour induire la sécrétion des hormones stéroïdes (testostérone et oestrogènes) par les testicules. Toutes ces stimulations sont

modulées par des mécanismes de feed-back dus aux sécrétions du testicule, mais aussi très certainement par des interactions locales entre cellules dans le testicule, principalement les cellules de Leydig et les cellules de Sertoli.

Le contrôle hormonal

Chez l'étalon au repos sexuel, la fréquence approximative est, selon les auteurs, d'un

M. VIDAMENT

INRA-Haras
Nationaux, PRMD,
Equipe Reproduction
Equine, 37380 Nouzilly

e-mail :
marianne.vidament@
tours.inra.fr

pulse par heure pour GnRH, FSH, LH ou de 3 à 8 pics par jour pour LH et testostérone. La variabilité des concentrations de testostérone et d'oestrogènes due à la pulsativité est peu importante par rapport à celle existant entre étalons. Pour apprécier le niveau basal de testostérone, il est préférable de doser deux prises de sang à 1 h d'intervalle dans un laboratoire disposant de références sur des étalons normaux. Le niveau moyen de testostérone est de 0,5 à 1 ng/ml. Celui des oestrogènes totaux est de 50 à 200 ng/ml, bien supérieur à celui d'une jument en chaleur. Pour FSH et LH, les dosages ne sont pratiqués que par quelques laboratoires dans le monde.

La LH stimule la production de la testostérone et des oestrogènes par les cellules de Leydig. Par rapport aux autres mammifères, l'étalon sécrète d'énormes quantités d'oestrogènes (par aromatisation de la testostérone dans les cellules de Leydig). Il s'agit essentiellement de sulfate d'oestrone. Ce stéroïde pourrait être impliqué de manière locale dans la production et la maturation des spermatozoïdes. Chez l'étalon, la testostérone inhibe LH et stimule FSH, alors que c'est l'inverse pour les oestrogènes. FSH se lie très probablement aux cellules de Sertoli et entraîne la sécrétion de l'inhibine, de l'activine, de l'ABP (Androgen Binding Protein) et d'autres facteurs nécessaires à la spermatogénèse. Inhibine et activine vont respectivement inhiber ou activer la sécrétion de FSH. Les taux de FSH, LH et testostérone seraient reliés à la quantité de spermatozoïdes produits par gramme de testicule.

Des stimulations sexuelles d'intensité croissante (masturbation, présentation à une jument en oestrus, éjaculation) provoquent des pics de sécrétion croissants d'ocytocine plasmatique chez l'étalon, en relation avec la sécrétion de la LH, suggérant un certain rôle de l'ocytocine dans la régulation des gonadotrophines.

Facteurs de variation des taux hormonaux

Chez l'étalon, les taux hormonaux de LH, de FSH, de testostérone et d'oestrogènes sont plus élevés durant le printemps et l'été, même si l'étalon est capable de se reproduire toute l'année. La FSH augmente d'abord, puis la LH et enfin la testostérone. Un traitement photopériodique avance cette augmentation dans la saison. Pour les étalons pur sang cumulant deux montes par an (une dans chaque hémisphère), on ne connaît pas à terme l'effet du changement d'hémisphère sur le rythme annuel de ces hormones, même si la fertilité semble intacte.

L'âge joue également un rôle sur les taux de FSH et de LH et, dans une moindre mesure, de testostérone et d'oestrogènes. Les taux sont très bas avant 2 ans, augmentent fortement jusqu'à 4-5 ans et plus progressivement jusqu'à 13-20 ans.

Le niveau de testostérone ainsi que le comportement sexué et agressif augmentent lors d'activité sexuelle plus intense, de contacts

sociaux avec les juments ou de changement dans la hiérarchie des mâles d'un troupeau en liberté (passage du statut de célibataire à celui d'étalon de harem). Le taux de testostérone des étalons maintenus en boxes sans contact avec les juments est faible du fait du peu de stimuli sociosexuels.

Une injection unique de GnRH provoque une élévation rapide et limitée dans le temps des taux de FSH (150 %), de LH (>150 %) (15 minutes à 4 h) et de testostérone (>200 %) (1h 30 à 5 h). Cette élévation est plus forte en dehors de la saison sexuelle que pendant celle-ci.

Une injection unique d'hCG (2500 UI IV), qui a un effet de type LH, entraîne une augmentation de testostérone 1 h après, mais surtout une 2ème augmentation 30 h après, très nette pour la testostérone (800 %) et moindre pour les oestrogènes (125 %).

Les étalons subfertiles

Bien que les causes de la subfertilité et de l'infertilité soient diverses, il semblerait pourtant qu'un consensus scientifique se dégage pour décrire un profil hormonal courant chez ce type d'étalons.

La majorité des étalons subfertiles ou infertiles présente des taux basaux de LH et de FSH plus élevés, des taux d'oestrogènes et d'inhibine plus faibles et un niveau basal de testostérone en général normal.

Après une stimulation par GnRH, les étalons infertiles montrent une augmentation de LH, qui n'est pas influencée par la saison. Ils ne présentent pas d'élévation de la testostérone. Après une stimulation par hCG, la réponse de la testostérone chez les étalons subfertiles, mais surtout chez les infertiles est souvent faible, montrant ainsi une inaptitude du testicule à répondre à la stimulation.

Ce profil hormonal (de base et après stimulation) est plus courant après 15 ans, âge à partir duquel la fertilité des étalons baisse. Il s'agit certainement d'une atteinte primaire du testicule (dégénérescence) puisque la réactivité de l'axe hypothalamo-hypophysaire semble intacte. Les hypothèses sont les suivantes : la cellule de Sertoli produirait moins d'inhibine en même temps que la production de spermatozoïdes commencerait à diminuer, la FSH serait alors plus élevée, les cellules de Leydig commenceraient à dysfonctionner, produisant moins de testostérone, ce qui entraînerait une élévation de LH.

Les étalons cryptorchides

Le devenir d'un testicule qui ne descend pas dans le scrotum et qui reste en position abdominale ou inguinale est variable. Il peut régresser totalement ou produire de la testostérone et des oestrogènes, mais toujours moins qu'un testicule normal. La testostérone basale des étalons cryptorchides permet dans 90 % des cas de mettre en évidence du tissu testiculaire sur les animaux de plus de 2 ou 3 ans. Les hongres présentent des concentrations inférieures à 0,04 ou 0,024 ng/ml suivant les auteurs, alors que les cryptorchides pré-

sentent des taux supérieurs à 0,1 ng/ml. Le niveau basal de sulfate d'oestrone est inférieur à 0,12 ng/ml chez le hongre, alors que celui des étalons cryptorchides est supérieur à 0,4 ou à 1 ng/ml chez des animaux de plus de 3 ans, sauf chez les baudets. La réponse au test hCG 24 h après l'injection est moindre chez les étalons cryptorchides comparés aux étalons normaux. Cette réponse est tout de même nette pour la testostérone, mais inconstante pour les oestrogènes.

Par conséquent, les niveaux basaux de testostérone et d'oestrogènes semblent complémentaires pour comprendre si un étalon est cryptorchide ou non. Le test hCG permet d'aider à la distinction.

Conclusion

La meilleure connaissance des mécanismes hormonaux permet ou permettra de mieux gérer les étalons fertiles, de mieux caractériser les causes de subfertilité et de plus facilement mettre en évidence les étalons cryptorchides.

Pour en savoir plus :

Amann R.P., 1993. Physiology and endocrinology. In : McKinnon A.O. and Voss J.L. (eds), *Equine Reproduction*, 658-685. Philadelphia, Lea & Febiger.

Chaffaux S., 1992. Le testicule de l'étalon, glande endocrine. *Rec. Med. Vet.*, 168, 907-915.

Clément F., 1995. Etude d'une population d'étalons infertiles : apport au diagnostic et à l'étiologie de l'infertilité. Thèse de doctorat en sciences agronomiques, ENSA. M, Montpellier, 155 p.

McDonnell S.M., Murray S.C., 1995. Bachelor and harem stallion behavior and endocrinology. *Biol. Reprod. Mono1*, 577-590.

Palmer E., Silva R., Guillaume D., Magistrini M., Vidament M., 1999. Prediction of decreased fertility in old stallions by hormonal analysis. *J. Reprod. Fert., Suppl.* (in press).

Rodgers D.H., Hanson R.R., 1997. Cryptorchidism in horses 1- anatomy, causes and diagnosis. *Comp. Cont. Educ. Pract. Veter.*, 19, 1280-1289.

Roser J.F., 1997. Endocrine basis for testicular function in the stallion. *Theriogenology*, 48, 883-892.

L'insémination artificielle chez les équins

M. MAGISTRINI

INRA-Haras
Nationaux, PRMD,
Equipe Reproduction
Equine, 37380 Nouzilly

e-mail :
michele.magistrini@
tours.inra.fr

L'insémination artificielle (IA) chez les équins s'est développée en France il y a environ 20 ans, grâce à une collaboration entre l'INRA et les Haras Nationaux qui ont ainsi pu proposer aux éleveurs des techniques utilisables sur le terrain. Celles-ci ont évolué en fonction des résultats de la recherche et sont actuellement de deux types : IA de semence fraîche (immédiate ou différée) ou de semence congelée. Cependant toutes les méthodes ne sont pas applicables à l'ensemble des reproducteurs car la qualité de la semence de certains étalons les exclut de certains types d'IA.

La sélection des étalons

Parmi les étalons jugés aptes à la reproduction, 95 % peuvent être exploités en IA de semence fraîche immédiate et 75 % en IA de semence fraîche différée (dans la journée) et, parmi ceux-ci, 80 % ont une semence dite " congelable " (source Haras Nationaux). Cette sélection est faite après examen des caractéristiques séminales quantitatives et qualitatives de l'étalon candidat au cours du spermogramme qui consiste en l'examen de 5 éjaculats collectés à 24 h d'intervalle. Des seuils ont été définis pour chaque caractéris-

tique analysée et diffèrent en fonction du type d'IA. Ainsi, les conditions d'utilisation d'un étalon en IA de semence fraîche immédiate sont identiques à celles de l'acceptation d'un étalon à la mise à la reproduction. Pour les IA différées, les conditions sont plus strictes. Les paramètres qui seront déterminants pour la sélection de l'étalon sont : la concentration en spermatozoïdes des éjaculats et la mobilité des spermatozoïdes après des survies de 24 et 48h à +4 °C (Clément et Vidament 1998). Les conditions d'acceptation d'un étalon à l'IA de semence congelée sont encore plus strictes : il doit satisfaire aux conditions de l'IA de semence différée et, de plus, sa semence subit un test de congélation. Il ne sera retenu que si, sur au moins 6 éjaculats congelés, plus de 3 sont sélectionnés après contrôle. Le contrôle consiste en l'examen de 3 paillettes par éjaculat dont le pourcentage de spermatozoïdes mobiles doit être supérieure à 35 %. Actuellement, avec la technique utilisée dans les laboratoires de congélation des Haras Nationaux, au moins 69 % des éjaculats produits sont conservés (Magistrini et Vidament 1999).

Les techniques actuelles et les résultats de fertilité

Les techniques actuellement utilisées dans les Haras Nationaux français et dans les haras privés en France et à l'étranger ne diffèrent pas fondamentalement des autres (Magistrini et Vidament 1999).

Insémination artificielle de semence fraîche (immédiate et différée)

Dans les Haras Nationaux, lorsque l'IA est faite immédiatement après la collecte, la semence est utilisée pure (IA dans les 5 minutes qui suivent la collecte) ou après dilution à la température de 37 °C dans du lait demi-écrémé UHT (IA dans les 30 minutes qui suivent la collecte). Cette technique permet d'obtenir, avec des doses d'IA de 200×10^6 spermatozoïdes totaux, une fertilité par cycle de 53 % dans les races de sang ($n=7756$ cycles ; résultats Haras Nationaux, monte 1998). Cette méthode, peu utilisée dans les races de trait, donne des résultats tout aussi satisfaisants (61 % de fertilité par cycle, $n=251$).

Lorsque l'IA est différée, la semence est systématiquement réfrigérée et conservée à 4 °C dans du lait demi-écrémé UHT supplémenté d'antibiotiques lorsque la durée de conservation est inférieure à 12 h et dans le milieu INRA82 ou le milieu de Kenney quand la conservation dure de 12 à 24 h. La dose d'IA est également de 200×10^6 spermatozoïdes totaux. Que l'on pratique l'IA immédiate ou différée (dans la journée), les juments sont suivies à la barre (détection des chaleurs) et inséminées toutes les 48 heures jusqu'à l'ovulation constatée par échographie ou jusqu'au refus, c'est-à-dire jusqu'à la fin des chaleurs détectée par l'étalon. La fertilité est alors de 52 % dans les races de sang et de 50 % dans les races de trait ($n=2516$ et $n=6029$ respectivement ; résultats Haras Nationaux, monte 1998) lorsque la conservation n'excède pas 12 heures. L'IA différée de plus de 12 h est utilisée de façon ponctuelle sur le terrain et peu de résultats fiables sont disponibles.

A l'étranger les milieux de dilution de la semence sont à base de lait et le milieu le plus utilisé est celui de Kenney (Kenney *et al* 1975) avec certaines variantes qui portent sur la quantité d'antibiotiques et sur des additifs (jaune d'œuf, sucres, substances tampons, activateurs de la mobilité, etc). La température de conservation la plus utilisée est 4 °C et les juments sont inséminées avec des doses contenant de 250 à 500×10^6 spermatozoïdes dits progressifs, c'est-à-dire dont la trajectoire est rectiligne. Une telle dose correspond à environ 700×10^6 spermatozoïdes totaux. Il n'y a pas de publication de résultats de fertilité sur un nombre important de cycles (Katila 1997).

Insémination artificielle de semence congelée

La technique de congélation de la semence utilisée actuellement dans les laboratoires

des Haras Nationaux (Vidament *et al* 1998) dérive de celle décrite par Palmer (1984). Les milieux de dilution et de congélation sont composés d'une base commune, l'INRA82, supplémenté respectivement de 2 % de jaune d'œuf ou de 2 % de jaune d'œuf et 2,5 % de glycérol. Cette méthode a permis d'améliorer significativement la mobilité des spermatozoïdes à la décongélation ainsi que la fertilité et d'augmenter le nombre de paillettes produites par éjaculat. La cyclicité des juments est contrôlée par échographie et elles sont inséminées tous les jours jusqu'à ovulation à partir de la détection d'un follicule de 35 mm. La dose d'insémination est de 400×10^6 spermatozoïdes totaux et il est recommandé de faire au moins deux inséminations avant l'ovulation pour obtenir une fertilité optimale.

Au cours des saisons de monte 95-97 dans les stations des Haras Nationaux, la fertilité par cycle a ainsi été de 56 % ($n=243$ cycles) vs 42 % ($n=190$) pour la technique témoin. Ces résultats se sont confirmés lors de la saison de monte 1998 : la fertilité par chaleur a été de 49 % sur un nombre de cycles exploités beaucoup plus important ($n=1018$).

A l'étranger, les techniques diffèrent de celle décrite plus haut par le milieu de base et par les proportions de jaune d'œuf (de 2 à 20 %) et de glycérol (de 2,5 à 6 %) utilisées. Certaines discussions portent aussi sur les vitesses de descente de température (de 37 °C à 4 °C) jusqu'au moment de la congélation. Les résultats de fertilité publiés portent sur un nombre réduit de cycles exploités et varient de 20 à 50 % (Magistrini et Vidament 1999).

Les nouveautés techniques et les orientations

Insémination artificielle de semence fraîche différée

La température de 4 °C est couramment utilisée lors d'IA de semence fraîche différée. Cependant la réfrigération de la semence de 37 °C à 4 °C met en jeu des remaniements des membranes des spermatozoïdes qui sont regroupés sous le terme de " choc froid " (" cold shock "). Ceci provoque une cascade d'événements qui aboutissent à la perte du pouvoir fécondant et à la mort des cellules. Une des conséquences de ce " choc froid " est l'oxydation des membranes des spermatozoïdes. Il est possible de limiter ces dégradations de deux façons : par la conservation des spermatozoïdes à une température plus élevée ou par l'apport d'agents anti-oxydants dans les milieux de conservation.

Afin de limiter les effets néfastes de la descente de température jusqu'à 4 °C, des études sur la conservation des spermatozoïdes à des températures supérieures ont été réalisées. Certaines études de comparaison (5 °C vs 20 °C) réalisées aux Etats-Unis font état de résultats contradictoires. Par

ailleurs une étude française montre une amélioration significative de la fertilité par cycle (57 % vs 41 %) lors de conservation de la semence à la température de 15 °C dans un milieu chimiquement défini comportant une fraction purifiée du lait vs à la température de 4 °C dans le lait pendant 24 h avant insémination (Batellier *et al* 1997 et 1998).

L'apport d'anti-oxydants (vitamine C, acide xanthurénique) dans les milieux, rapporté dans deux études récentes, autrichienne et américaine, permettent d'améliorer la mobilité des spermatozoïdes *in vitro*; cependant ces études ne font état d'aucun résultat de fertilité.

Insémination artificielle de semence congelée

Les orientations actuelles portent sur l'apport de différentes molécules dans le milieu de congélation.

L'addition d'un acide aminé, la glutamine, améliore significativement la mobilité post-décongélation des spermatozoïdes *in vitro*; un éventuel effet sur la fertilité est actuellement testé. Cependant le mécanisme d'action de cet acide aminé n'est pas élucidé.

Une autre approche consiste à modifier la composition de la membrane des spermatozoïdes afin de la rendre plus résistante aux effets du froid. L'apport de liposomes composés de cholestérol-phosphatidylsérine dans le milieu donne des résultats contradictoires tant en terme de mobilité que de fertilité. Récemment l'incubation de spermatozoïdes avec une molécule "transporteur" de cholestérol a permis d'améliorer la mobilité des spermatozoïdes à la décongélation, mais l'effet sur la fertilité n'a pas encore été testé.

Conclusion

Les techniques d'insémination artificielle permettent désormais d'obtenir une fertilité proche de celle obtenue en saillie naturelle (57 %, n=11260 cycles; résultats Haras Nationaux, monte 98) à la condition de sélectionner la méthode la plus adaptée à la qualité de la semence de l'étalon concerné. Cependant un certain nombre d'étalons candidats, dont le potentiel génétique et/ou les performances sportives sont très intéressants pour les éleveurs, n'ont pas accès à ces

méthodes de diffusion. Il est donc indispensable de poursuivre les efforts entrepris afin de mieux maîtriser les éléments indispensables à une survie optimale des spermatozoïdes *in vitro* et au maintien de leur fertilité *in vivo*.

Pour en savoir plus

Batellier F., Duchamp G., Yvon J.M., Vidament M., Arnaud G., Mouysset C., Vincent P., Palmer E., Magistrini M., 1997. Mise au point d'un dilueur chimiquement défini pour l'insémination artificielle immédiate et différée. 23e Journée de la recherche équine, Institut du Cheval, département DEFI, Paris, 97-105.

Batellier F., Vidament M., Noue P., Clément F., Magistrini M., Palmer E., 1998. Les techniques d'insémination artificielle. Le Point Vétérinaire, 29 (189), 53-59.

Clément F., Plongère G., Magistrini M., Palmer E., 1998. Appréciation de la fonction sexuelle de l'étalon. Le Point Vétérinaire, 29 (191), 343-348.

Clément F., Vidament M., 1998. Facteurs influençant la fertilité des étalons nationaux. Le Point Vétérinaire, 29 (193), 717-723.

Insémination artificielle équine - Guide Pratique - 1996. Edition Institut du Cheval, Paris, 292 p.

Katila T., 1997. Procedures for sperm handling fresh stallion semen. Theriogenology, 48, 1217-1227.

Kenney R.M., Bergmann R.V., Cooper W.L., Morse G.W., 1975. Minimal contaminations techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. Proc. 21st Am. Assoc. Equine Pract., 327-336.

Magistrini M., Vidament M., 1992. L'insémination artificielle chez les équidés. Rec. Méd. Vét., 168, spécial Reproduction des Equidés, 959-967.

Magistrini M., Vidament M., 1999. L'insémination artificielle équine: des technologies à géométrie variable. CR 25e Journée de la recherche équine, Institut du Cheval, département DEFI, INA, Paris, 117-128.

Palmer E., 1984. Factors affecting stallion semen survival and fertility. Proc. 10th Int. Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem., 377.

Vidament M., Ecot P., Dupéré A.M., Noue P., Bourgeois C., Couty I., Yvon J.M., Magistrini M., Palmer E., 1998. La semence congelée d'étalon: améliorations récentes. 24e Journée de la recherche équine, Institut du Cheval, département DEFI, INA, Paris, 25-38.

M. MAGISTRINI

INRA-Haras
Nationaux, PRMD,
Equipe Reproduction
Equine, 37380 Nouzilly

e-mail :
michele.magistrini@
tours.inra.fr

La qualité des spermatozoïdes et du plasma séminal : quelles sont les fonctions explorables ?

Actuellement la méthode de routine pour évaluer la fertilité potentielle d'un étalon est la réalisation d'un spermogramme (collecte de 5 éjaculats à 24 h d'intervalle) au cours duquel des paramètres séminaux quantitatifs (volume, concentration et nombre total en spermatozoïdes, pH) et qualitatifs (pourcentages de spermatozoïdes mobiles, vivants, de formes anormales) sont analysés. Cependant certains étalons, dont les paramètres séminaux sont supérieurs ou égaux aux seuils définis, ont une fertilité réduite. D'autre part, après conservation de la semence à l'état frais ou congelé, on observe parfois des résultats incohérents entre la mobilité des spermatozoïdes et la fertilité. Il semble donc indispensable d'étudier d'autres critères afin d'expliquer et/ou de pallier ces problèmes de subfertilité ou d'infertilité. De plus l'utilisation de critères permettant d'évaluer d'autres fonctions que la mobilité pourrait nous permettre de mettre en évidence et d'expliquer des différences entre techniques de conservation.

Les spermatozoïdes sont des cellules complexes qui doivent maintenir l'intégrité de toutes ou partie de leurs fonctions pour être fécondants. Sur le tableau 1 sont présentés les différents compartiments de la cellule et les fonctions qui y sont associées. Pour évaluer ces fonctions, des tests ont été mis au point et sont développés chez les équins. Malheureusement ils n'ont pas pour le moment dépassé les limites du laboratoire. La plupart de ces méthodes font appel à la microscopie à fluorescence et parfois à la cytométrie en flux. Cette technique permet d'analyser un nombre très élevé de cellules en un temps très court.

Les spermatozoïdes

La tête du spermatozoïde

La membrane plasmique

Pour pouvoir se fixer à la zone pellucide de l'ovocyte, le spermatozoïde doit avoir une membrane plasmique intègre. Pour évaluer cette intégrité, la coloration à l'éosine-nigrosine a été largement développée dans les différentes espèces de mammifères domestiques. Plus récemment de nouvelles méthodes ont été mises au point.

Sondes de vitalité

Le kit " Fertilight " est composé de 2 sondes fluorescentes qui se fixent sur l'ADN du noyau : le SYBR-14 colore en vert le noyau de toutes les cellules et l'iodure de propidium ne pénètre que dans les cellules dont la membrane est lésée. Ainsi des spermatozoïdes vivants émettront une fluorescence verte et les spermatozoïdes morts une fluorescence rouge ; il peut arriver que certains spermatozoïdes présentent les deux colorations ; ils sont alors classés dans une 3ème catégorie : les " moribonds ". Ces sondes peuvent être analysées en microscopie à fluorescence, mais aussi en cytométrie en flux. D'autres associations de sondes ont été utilisées pour évaluer la vitalité des spermatozoïdes : la carboxyfluorescéine (CFDA) ou ses dérivés, associée à l'iodure de propidium, la calcéine-AM associée à l'éthidium homodimère-1.

Test de fixation à la zone pellucide

Il est indispensable de disposer d'ovocytes équins en grande quantité, ce qui limite l'utilisation de cette méthode. Pour pallier ce pro-

Tableau 1. Fonctions cellulaires du spermatozoïde et méthodes d'analyse.

Compartiments cellulaires et fonctions analysées	Méthodes d'analyse
Tête du spermatozoïde Intégrité de la membrane plasmique Intégrité de l'acrosome Intégrité de l'ADN	Sondes fluorescentes : SYBR-14 et Iodure de propidium Lectine (agglutinine de <i>Pisum sativum</i>) + marqueur fluorescent (isothiocyanate de fluorescéine) Sonde fluorescente : acridine orange
Flagelle Contenu énergétique Intégrité de la membrane plasmique Intégrité de l'activité du flagelle	Evaluation de l'ATP : dosage ou sonde fluorescente (Rhodamine 123) Test hypo-osmotique Analyse automatisée de la mobilité : CASA (Computer Assisted Sperm Analysis)

blème, les travaux ont été réalisés sur des ovocytes stockés dans des solutions hypersalines. Ils ont montré une relation entre le nombre de spermatozoïdes fixés à la zone pellucide et la fertilité des étalons. Cependant ce test est lourd à mettre en place et il est utilisé de façon ponctuelle dans peu de laboratoires.

L'acrosome

La vésicule acrosomique recouvre le noyau du spermatozoïde et se met en place au cours de la spermiogenèse dans le testicule. Après sa fixation à l'ovocyte, le spermatozoïde doit traverser la zone pellucide et pour cela, il doit faire " la réaction acrosomique ". Cette réaction consiste en la fusion entre la membrane plasmique et la membrane acrosomique externe qui va libérer les enzymes nécessaires au passage de la zone pellucide. De nombreuses colorations ont été décrites dans la littérature et, depuis quelques années, l'utilisation d'une lectine, l'agglutinine de *Pisum Sativum*, couplée à un marqueur fluorescent, l'isothiocyanate de fluorescéine, a été développée.

Après perméabilisation de la membrane plasmique, cette lectine se fixe au contenu de l'acrosome et met ainsi en évidence la présence ou l'absence de la vésicule acrosomique. Cette méthode a été utilisée pour évaluer la capacitation des spermatozoïdes dans des programmes de fécondation assistée et aussi pour quantifier les dommages éventuels provoqués par certains traitements de la semence et en particulier par la congélation.

Le noyau : chromatine / ADN

La stabilité de la chromatine (ADN + protéines) du spermatozoïde est indispensable à une fécondation normale et au développement embryonnaire. La stabilité de l'ADN dépend des protéines qui y sont associées (protamines et/ou histones). La condensation maximale de la chromatine du noyau des spermatozoïdes éjaculés est liée à la présence des protamines et les défauts de condensation peuvent être à l'origine de certaines formes anormales de la tête.

Un test a été mis au point chez différentes espèces de mammifères domestiques (bovins, porcins et équins) afin d'évaluer la résistance de l'ADN à une dénaturation induite par la chaleur (100 °C) ou par un milieu acide. Cette méthode utilise un colorant fluorescent, l'acridine orange, qui a la propriété d'émettre une fluorescence verte quand il se fixe à de l'ADN natif (double brin), et une fluorescence rouge quand il se fixe à de l'ADN dénaturé (mono brin). Le taux de dénaturation est évalué par le rapport entre la proportion de spermatozoïdes émettant une fluorescence rouge et la population totale de spermatozoïdes (fluorescences verte + rouge). Il a été ainsi montré qu'il existait une corrélation négative entre le taux de dénaturation et certains paramètres (mobilité, formes anormales) des spermatozoïdes et avec la fertilité. Ce type d'analyse peut être réalisée en microscopie à fluorescence mais aussi en cytométrie en flux.

Le flagelle

La membrane plasmique

Un test datant des années 70-80 a été mis au point dans l'espèce humaine et consiste à plonger les spermatozoïdes dans une solution hypo-osmotique. En réponse à ce stress, les spermatozoïdes vont réagir comme des osmomètres : si leur membrane plasmique est intacte, ils vont présenter des formes caractéristiques de gonflement au niveau du flagelle correspondant à une entrée d'eau dans la cellule. Si la membrane est lésée, aucun gonflement ne sera observé. Ainsi les spermatozoïdes " gonflés " sont ceux dont la membrane plasmique du flagelle est intacte. Ce test a été utilisé en particulier pour évaluer la qualité des spermatozoïdes équins après congélation.

Les mitochondries de la pièce intermédiaire

Les mitochondries sont considérées comme la centrale énergétique du spermatozoïde. Le contenu en énergie peut être évalué par le dosage du contenu en ATP de la cellule et la fonctionnalité des mitochondries par marquage avec une sonde fluorescente, la rhodamine 123. Certains travaux ont mis en évidence une corrélation entre la mobilité des spermatozoïdes et le contenu en énergie des cellules.

La mobilité des spermatozoïdes résulte de l'association de différentes fonctions et en particulier de l'intégrité du flagelle dans son ensemble (membrane, mitochondries, cytosquelette). La mobilité est le critère de qualité le plus utilisé. Cependant son analyse au microscope reste subjective, aussi des systèmes automatisés de mesure assistés par ordinateur ou CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) ont été développés. L'analyse des spermatozoïdes se fait grâce à un système optique composé d'une source de lumière, d'un microscope et d'une caméra vidéo qui digitalise les images. Ces images sont ensuite traitées par un ordinateur intégré qui permet de définir de façon objective et répétable des paramètres tels que la proportion de spermatozoïdes mobiles, leur vitesse, la linéarité de leurs trajectoires, etc.

Actuellement tous les éjaculats congelés des étalons nationaux sont sélectionnés sur le critère de mobilité analysé par CASA avant leur mise sur le marché.

Le plasma séminal

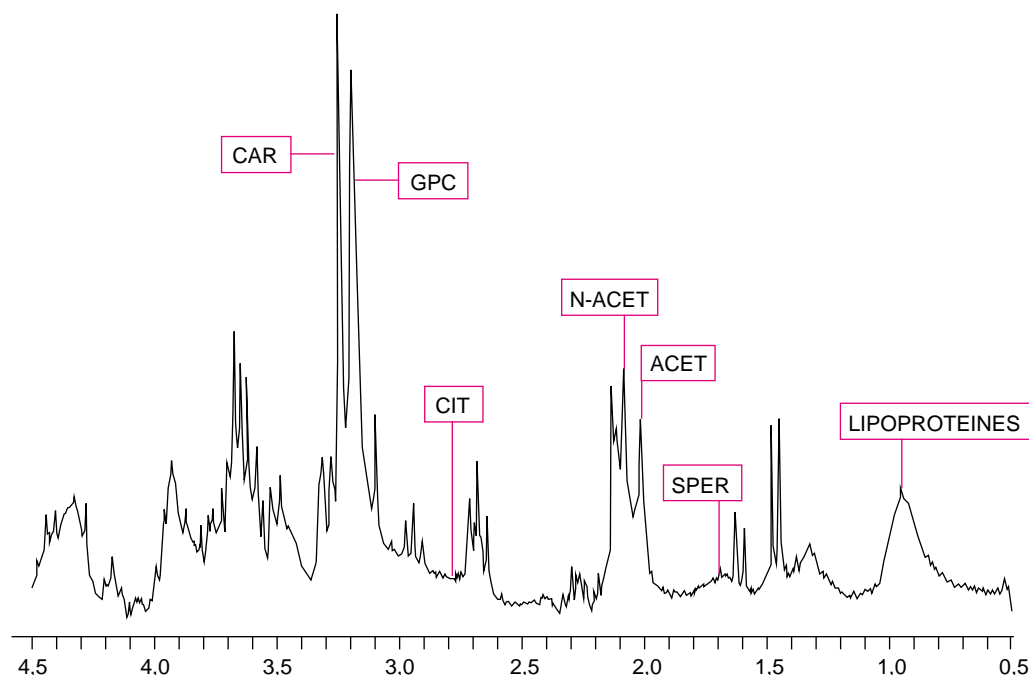
Lors de l'évaluation de la qualité de la semence, il ne faut pas négliger le fluide dans lequel les spermatozoïdes sont émis au moment de l'éjaculation. Le plasma séminal a une importance d'autant plus grande que 1) les spermatozoïdes ne peuvent survivre in vitro dans ce milieu sans être au préalable dilués, 2) sa composition dépend des sécrétions de l'épididyme et des glandes annexes du tractus génital (volume et qualité).

L'utilisation de la spectroscopie de résonance magnétique nous a permis d'identifier et de quantifier des molécules considérées comme

Figure 1. Profil de spectroscopie de résonance magnétique du proton du plasma séminal équin (Magistrini et al 1995).

Marqueurs des glandes annexes :

- épididyme : carnitine (CAR), glycérophosphorylcholine (GPC)
- ampoule déférente : fonction N-acétyl (N-ACET), spermine (SPER), lipoprotéines
- glandes bulbo-uréthrales : acétate (ACET)
- vésicules séminales : citrate (CIT)



marqueurs des sécrétions de l'épididyme et des glandes annexes du tractus génital. L'intérêt de cette méthode est qu'elle permet en une seule analyse d'évaluer la totalité des molécules alors que la méthode biochimique nécessite de faire autant de dosages qu'il y a de molécules à analyser (figure 1).

Il est donc possible d'estimer la participation de chacune des sécrétions à l'éjaculat. Des relations entre certaines molécules marqueurs et la qualité des spermatozoïdes ont été mises en évidence ; cependant des expériences complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats.

Conclusion

Des corrélations entre différents tests ont été mises en évidence : la mobilité, la viabilité, l'intégrité de l'acrosome, le contenu en ATP, le test HOS ; en particulier le test HOS réalisé dès la collecte de la semence est corrélé à la mobilité mesurée après congélation-décongélation (Vidament *et al* 1998). Cependant aucune corrélation n'a pour le moment été mise en évidence entre un test et la fertilité. Il est certainement utopique de croire qu'un seul critère pourra caractériser la qualité d'un éjaculat ou la fertilité d'un éta-

lon. Il semble beaucoup plus probable que des associations judicieuses de certains tests nous permettront de progresser dans l'évaluation de la qualité de la semence et par conséquent dans l'estimation de la fertilité de l'étalon.

Pour en savoir plus

Foucat L., 1990. Principes de base de la résonance magnétique nucléaire. Cahier des techniques de l'INRA, 23, 5-24.

Magistrini M., Guitton E., Le Vern Y., Nicolle J.-C., Vidament M., Kerboeuf D., Palmer E., 1997. New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry. *Theriogenology*, 48, 1229-1235.

Magistrini M., 1999. Semen evaluation. In : Juan Samper (ed), *Equine breeding management and artificial insemination*, Ch. 8. Saunders (sous presse).

Vidament M., Cognard E., Yvon J.M., Sattler M., Palmer E., Magistrini M., 1998. Evaluation of stallion semen before and after freezing. *Reprod. Dom. Anim.*, 33, 271-277.

Malmgren L., 1992. Sperm morphology in stallions in relation to fertility. *Acta Veterinaria Scandinavica*, Suppl. 88, 39-47.